

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Molekulární biologie a genetika eukaryot



Radan Matura

**Vliv fixačních činidel na kvalitu a kvantitu nukleových kyselin v
archivovaných vzorcích tkání**

The effect of fixatives on DNA quality and quantity in archival tissue
specimens

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Daniel Vaněk, Ph.D.

Praha 2016

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 14. 8. 2016

.....
podpis

Poděkování

Děkuji mému školiči, RNDr. Danielu Vaňkovi, Ph.D., za to, že mi u něj v laboratoři umožnil vypracovat diplomovou práci. Děkuji MUDr. Tomáši Vojákovi za odběr vzorků. Dále děkuji Mgr. Jiřině Josefiové za všestrannou duševní a fyzickou pomoc a Mgr. Jitce Votrubové a Mgr. Barboře Emmerové za vytvoření myšlenkově stimulujícího prostředí. V neposlední řadě děkuji svým blízkým za jejich materiálně-mentální podporu.

Abstrakt

Formaldehyd je široce používané fixační činidlo. Jeho výhodou je nízká cena, jednoduché použití a výborné fixační vlastnosti, především rychlé pronikání do tkání, dobré zachovávání morfologických struktur tkáně a kompatibilita s následnými histologickými analýzami. Jeho nevýhodou jsou však negativní účinky na nukleové kyseliny. Vlivem jeho působení dochází k modifikaci primární struktury deoxyribonukleové kyseliny (DNA, z angl. deoxyribonucleic acid), její fragmentaci a vzniku vazeb na proteiny, které znesnadňují izolaci takovéto DNA. Míra negativních účinků formaldehydu je závislá na mnoha faktorech. V této práci byl zkoumán vliv chemického složení roztoku formaldehydu (ředění roztoku, přítomnost pufru či kyseliny mravenčí) a vliv délky fixace. Posuzováno bylo množství DNA a míra fragmentace DNA získané z fixovaných tkání, a to metodou kvantitativní polymerázové řetězové reakce, fluorometrickým stanovením koncentrace DNA a pomocí čipové elektroforézy na přístroji bioanalyzátor Agilent 2100. Kvalita a kvantita získané DNA byla následně otestována také při stanovení DNA profilu pro identifikační účely analýzou STR (tandemová opakování krátkých motivů; z angl. short tandem repeats). Z výsledků vyplývá, že nejvhodnějším z testovaných roztoků formaldehydu je pufrovaný 4% formaldehyd, který poskytoval dostatečné množství DNA o potřebné kvalitě. Ostatní varianty roztoku formaldehydu (nepufrovaný 4% roztok, nepufrovaný 36% roztok či roztok s přídavkem kyseliny mravenčí) zhoršovaly kvalitu a kvantitu získané DNA více než 4% pufrovaný formaldehyd. Dále se ukázalo, že čím déle je tkáň fixována, tím nižší výtěžky a méně kvalitní DNA lze získat.

Klíčová slova: FFPE, formaldehyd, kvalita, DNA, fixace

Abstract

Formaldehyde is widely used fixative. Its advantages are low cost, simplicity of use and good fixation traits, which are fast tissue penetration, good preservation of morphological structures and compatibility with downstream histological applications. Formaldehyde disadvantages are negative effects on nucleic acids. Formaldehyde solutions modify primary structure of deoxyribonucleic acid (DNA), fragment DNA and create protein-DNA covalent bonds that hinder DNA isolation procedures. Level of negative effects of formaldehyde is dependent on many factors. Effect of formaldehyde chemical composition (formaldehyde dilution, presence of buffer or formic acid) and effect of fixation length were studied in this work. On DNA extracted from fixed tissues, DNA quantity and level of DNA fragmentation were studied by quantitative polymerase chain reaction, fluorescence assay for DNA quantification and by on-chip electrophoresis on bioanalyzer Agilent 2100. Quality and quantity of acquired DNA were tested by DNA profile determination for identification purposes using STR (short tandem repeats) analysis. Results show that of all tested fixatives, buffered 4% formaldehyde is the most suited solution in regards of sufficient amount of DNA and sufficient DNA quality. Other formaldehyde variants (non-buffered 4% formaldehyde, non-buffered 36% formaldehyde and formaldehyde solutions with addition of formic acid) worsened quality and quantity of acquired DNA more than buffered 4% formaldehyde. It was also shown that the longer the tissue is fixed the less DNA in worse quality is obtained.

Keywords: FFPE, formaldehyde, quality, DNA, fixation

Obsah

| | |
|---|----|
| Seznam použitých zkratk | 8 |
| 1 Úvod a cíle práce | 9 |
| 2 Literární přehled | 10 |
| 2.1 Fixace tkání | 10 |
| 2.1.1 Princip fixace tkání | 10 |
| 2.1.1.1 Předfixační faktory | 10 |
| 2.1.1.2 Faktory spojené s fixací | 10 |
| 2.1.1.3 Postfixační faktory | 11 |
| 2.1.2 Formaldehyd | 11 |
| 2.1.2.1 Příprava FFPE bločků | 13 |
| 2.1.2.2 Formaldehyd a jeho působení na DNA | 13 |
| 2.1.2.3 Faktory ovlivňující formaldehydovou fixaci ve vztahu k DNA | 15 |
| 2.2 Izolace DNA z FFPE bločků | 15 |
| 2.2.1.1 Předextrakční ošetření FFPE tkáně | 16 |
| 2.2.1.2 Extrakce DNA z FFPE bločků | 16 |
| 2.2.1.3 Post-extrakční úprava DNA izolované z FFPE bločků | 17 |
| 2.2.1.4 Výhody a nevýhody jednotlivých postupů izolace DNA z FFPE bločků | 18 |
| 2.3 Stanovení kvality DNA vyizolované z FFPE bločků | 19 |
| 2.3.1 Spektrofotometrické metody | 20 |
| 2.3.2 Fluorometrické metody | 21 |
| 2.3.3 Elektroforetické metody | 21 |
| 2.3.4 Metody založené na PCR | 22 |
| 2.3.4.1 Princip kvantitativní PCR | 22 |
| 2.3.4.2 Stanovení kvality DNA pomocí qPCR | 24 |
| 3 Materiál a metody | 26 |
| 3.1 Materiál | 26 |
| 3.1.1 Přístroje | 26 |
| 3.1.2 Použité chemikálie | 26 |
| 3.1.3 Tkáně | 27 |
| 3.1.4 Roztoky | 28 |
| 3.1.5 Primery pro kvantifikaci pomocí qPCR | 29 |
| 3.2 Metody | 29 |
| 3.2.1 Fixace I | 29 |
| 3.2.2 Fixace II, Fixace III a Fixace IV | 29 |
| 3.2.3 Odvodnění a zavodnění fixované tkáně (u Fixace II, Fixace III a Fixace IV) | 30 |
| 3.2.4 Izolace DNA | 30 |
| 3.2.5 Stanovení koncentrace a míry fragmentace DNA kvantitativní polymerázovou řetězovou reakcí (qPCR) | 31 |
| 3.2.6 Stanovení koncentrace DNA fluorometrickým měřením | 33 |
| 3.2.7 Stanovení koncentrace a míry fragmentace pomocí čipové elektroforézy na bioanalyzátoru Agilent 2100 | 33 |
| 3.2.8 Genetická identifikace analýzou krátkých tandemově se opakujících repetitiv (STR) | 34 |
| 4 Výsledky | 37 |
| 4.1 Délka fixace a chemické složení fixačního roztoku formaldehydu má vliv na množství a stupeň fragmentace vyizolované DNA | 38 |
| 4.1.1 Stanovení koncentrace a míry fragmentace DNA metodou qPCR | 39 |
| 4.1.2 Stanovení koncentrace DNA fluorometrickým měřením | 48 |

| | | |
|-------|---|----|
| 4.1.3 | Stanovení koncentrace a míry fragmentace DNA pomocí čipové elektroforézy na bioanalyzáru Agilent 2100..... | 50 |
| 4.2 | Před- fixační ošetření tkáně roztokem DNAgard Tissue nemá vliv na množství a stupeň fragmentace vyizolované DNA | 55 |
| 4.3 | Chemické složení fixačního roztoku formaldehydu a délka fixace ovlivňují získání úplného DNA profilu..... | 57 |
| 5 | Diskuze | 62 |
| 6 | Souhrn..... | 67 |
| 7 | Použitá literatura | 68 |
| 8 | Přílohy..... | 74 |
| | | |

Seznam použitých zkratk

| | |
|-------|--|
| DI | degradační index |
| DNA | deoxyribonukleová kyselina; z angl. deoxyribonucleic acid |
| FFPE | (tkáň) fixovaná formalínem, zalitá do parafinu; z angl. formalin-fixed, paraffin-embedded (tissue) |
| FRET | fluorescenční rezonanční přenos energie; z angl. fluorescence resonance energy transfer |
| PCR | polymerázová řetězová reakce; z angl. polymerase chain reaction |
| PNA | peptidová nukleová kyselina; z angl. peptide nucleic acid |
| PMI | posmrtný interval, post mortem interval |
| qPCR | kvantitativní polymerázová řetězová reakce; z angl. quantitative polymerase chain reaction |
| RNA | ribonukleová kyselina; z angl. ribonucleic acid |
| RT | pokojová teplota; z angl. room temperature |
| SDS | dodecylsírán sodný; z angl. sodium dodecyl sulfát |
| SNP | jednonukleotidový polymorfismus; z angl. single nucleotide polymorphism |
| STR | tandemová opakování krátkých motivů; z angl. short tandem repeats |
| 36NF | 36% (v/v) nepufrovaný formaldehyd |
| 4NF | 4% (v/v) nepufrovaný formaldehyd |
| 4PF | 4% (v/v) pufrovaný formaldehyd |
| 4PF+K | 4% (v/v) nepufrovaný formaldehyd s 4% (v/v) kyselinou mravenčí |

1 Úvod a cíle práce

Fixace tkání je základním procesem používaným pro dlouhodobé uchování tkání. Účelem fixace je zabránit samovolným autolytickým procesům, a umožnit tak následnou analýzu dané tkáně v co nejméně změněném stavu. S rozvojem molekulárně biologických metod začaly fixované vzorky představovat nejen materiál pro zejména mikroskopickou analýzu, ale také zdroj materiálu pro analýzu nukleových kyselin: ribonukleové kyseliny (RNA, z angl. ribonucleic acid) a deoxyribonukleové kyseliny (DNA, z angl. deoxyribonucleic acid).

V současné době je nejčastěji používaným fixačním činidlem formaldehyd. Jeho použití má na kvalitu (fragmentace či vyizolované množství) nukleových kyselin řadu negativních účinků. Tyto negativní účinky však mohou být alespoň do jisté míry potlačeny. Jednou z možností, jak získat nukleové kyseliny o vyšší kvalitě, je optimalizace fixačního procesu. Ta může být zaměřena například na chemické složení formaldehydu, dobu jeho působení na tkáň či teplotu, během níž fixace probíhá. Druhou variantu optimalizace představuje proces izolace nukleových kyselin z fixované tkáně. V tomto případě je důležitá volba samotné izolační metody a případné nastavení podmínek, za kterých probíhá.

Cíle diplomové práce byly následující:

- 1) V rešeršní části zmapovat možnosti optimalizace procesu fixace tkání formaldehydem a optimalizace procesu izolace DNA z tkání fixovaných formaldehydem vzhledem ke kvalitě získané DNA a shrnout metodické přístupy měření kvality DNA
- 2) V experimentální části určit vliv chemického složení roztoku formaldehydu a vliv délky fixace na kvalitu a kvantitu následně izolované DNA

2 Literární přehled

2.1 *Fixace tkání*

2.1.1 Princip fixace tkání

Fixace tkání je proces rychlé denaturace bílkovin pomocí fixačních faktorů a činidel. Jeho cílem je zabránit samovolným autolytickým procesům v buňkách a tkáních, a uchovat tak buněčné struktury a tělní tkáně v co nejpřirozenějším stavu (Vacek, 1996).

Fixované tkáně mohou být využity k histologickému barvení, imuno-histochemickému barvení, *in situ* hybridizaci, hmotnostní spektrometrii či izolaci deoxyribonukleové kyseliny (DNA, z angl. deoxyribonucleic acid) a ribonukleové kyseliny (RNA, z angl. ribonucleic acid) (Grizzle, 2009).

Kvalita zafixované tkáně, která zásadně ovlivňuje možnost izolace DNA z fixovaného vzorku, závisí na mnoha faktorech. Ty lze rozdělit na faktory předfixační, faktory spojené s fixací a faktory postfixační (Srinivasan *et al.*, 2002).

2.1.1.1 Předfixační faktory

Předfixačními faktory se myslí jevy působící na tkáň od chvíle jejího vyjmutí z organismu po moment započetí fixace. V závislosti na typu tkáně stačí i deset minut nedostatečného okysličení a v buňce začne docházet k významným biochemickým změnám, které v důsledku vedou k buněčné smrti (Kingsbury *et al.*, 1995). Ať už se jedná o nekrózu či apoptózu, oba tyto procesy ovlivňují (byť rozdílně) kvalitu izolovatelné DNA (Didenko *et al.*, 2003; Nagata, 2000; Zhang *et al.*, 2000). Je třeba si také uvědomit rozdíl vyjmutí tkáně z živého organismu a z organismu již mrtvého (tkáň v mrtvém těle se zpravidla nachází v anoxickém stavu již před vyjmutím).

2.1.1.2 Faktory spojené s fixací

Mezi faktory spojené s fixací patří fixační faktory a činidla použitá pro fixaci vzorku a podmínky, za kterých fixace probíhá. Jedná se zejména o délku fixace, teplotu, pH a objem fixačního činidla (Helander, 1994; Hewitt *et al.*, 2008).

Fixační činidla musí splňovat následující vlastnosti. Předně by měla dobře zachovávat strukturu buněk a tkání a zároveň co nejméně ovlivňovat anatomii a chemii

fixovaného vzorku (k určitým změnám vlivem fixačního činidla však dochází vždy a zabránit tomuto ději nelze). Dále by měla rychle pronikat do tkáně, aby zabránila autolýze v celém objemu a také by měla zachovat barvitelnost tkáně pro mikroskopickou analýzu. Fixační činidla a faktory dělíme na fyzikální (vysoké či nízké teploty) a chemické (Vacek, 1996).

Chemická fixační činidla dále dělíme na čtyři hlavní druhy: aldehydy, které způsobují zesíťování buněčných makromolekul (formaldehyd, glutaraldehyd); oxidační činidla způsobující zesíťování buněčných makromolekul (oxid osmičelý); činidla založená na alkoholech, která denaturují proteiny odvodněním (ethanol, methanol) a fixační činidla obsahující kovový prvek, tvořící nerozpustné sraženiny s buněčným materiálem (chlorid rtuťnatý) (Thavarajah *et al.*, 2012).

V dnešní době je nejrozšířenějším fixačním činidlem 4% neutrální pufovaný formaldehyd (Srinivasan *et al.*, 2002). Vzhledem k zaměření práce bude tomuto fixačnímu činidlu v textu věnován další prostor.

2.1.1.3 Postfixační faktory

Mezi nejvýznamnější postfixační faktory patří doba a podmínky skladování zafixované tkáně. Bylo ukázáno, že v čase dochází ke snížení detekovatelného množství DNA. V případě teploty skladování není známo, zda by uchovávání fixované tkáně za určitých teplot mohlo zabránit degradaci DNA. Optimálních podmínek při uchovávání fixovaného vzorku by však teoreticky mohlo být dosaženo použitím vakua, které by bránilo oxidaci vzorku (Srinivasan *et al.*, 2002).

2.1.2 Formaldehyd

Prvenství objevu formaldehydu (CH_2O , systematický název methanal) jakožto fixačního činidla se připisuje k roku 1893 Ferdinandu Blumovi, byť formaldehyd byl znám od roku 1859 díky Alexandru Butlerovovi (Fox *et al.*, 1985; Puchtler *et al.*, 1985).

Důvody, proč je formaldehyd stále široce používán, jsou jeho cena, relativně dobrá dostupnost a především splňuje požadavky na dobré fixační činidlo: velmi dobře zachovává anatomii velké většiny tkání, velmi rychle proniká do celého objemu vzorku (nicméně samotné zafixování trvá podstatně déle) a významně neinterferuje s barvicími metodami, a tedy ani s následnou mikroskopickou analýzou. Zároveň není uživatelsky náročný, například nemůže snadno dojít k „prefixování“ apod.

Při použití formaldehydu v histologii musíme brát na zřetel specifickou nomenklaturu. Za prvé, nasycený roztok formaldehydu nazýváme formolem či formalínem (100% formol či 100% formalín), přičemž se jedná o dva různé názvy pro stejný roztok. Za druhé, nasycený roztok formaldehydu ve vodě je nasycený jako 40%, vyjadřujeme-li procentuální podíl jako hmotnost/objem, a jako 37%, vyjadřujeme-li procentuální podíl jako hmotnost/hmotnost. Množství formaldehydu je v obou případech stejné, pokaždé se tedy jedná o stejný nasycený roztok, pouze se liší vyjádření procentuálního podílu formaldehydu v roztoku. Hovoříme-li tedy o 10% formolu, máme na mysli 4% roztok formaldehydu (jelikož 100% formol je 40% formaldehyd, kde 40% formaldehyd je nasyceným roztokem (vyjadřujeme-li procentuální podíl jako hmotnost/objem)). Právě 4% roztok formaldehydu se používá k fixaci tkání.

Při vyšších koncentracích formaldehyd samovolně polymerizuje, čemuž se zabraňuje přidáváním alkoholu (nejčastěji 10% methanolu), který slouží jako inhibitor této reakce.

Další vlastností formaldehydu je jeho přeměna ve vodném prostředí na methylglykol ($\text{CH}_2(\text{OH})_2$). Chemická rovnováha tohoto procesu je nakloněna silně ve prospěch methylglykolu, a ten se tudíž nachází ve vodných roztocích formaldehydu v relativně vysokých koncentracích. Zpět na formaldehyd se methylglykol přeměňuje odebráním formaldehydu z roztoku prostřednictvím jeho vyvazování do fixované tkáně. Toto postupné „doplňování“ formaldehydu je důvodem jeho relativně nízké fixační rychlosti (Fox *et al.*, 1985).

Poslední výraznou vlastností formaldehydu je jeho přeměna na kyselinu mravenčí (CH_2O_2), jejíž přítomnost při fixaci zhoršuje kvalitu histologických preparátů. K přeměně na kyselinu mravenčí dochází samovolně oxidací a neutralizuje se přidáním uhličitanu vápenatého (CaCO_3), uhličitanu hořečnatého (MgCO_3), fosfátovými solemi či přečištěním na iontoměniči. Kyselina mravenčí se vyskytuje již ve formaldehydu zakoupeném z výroby, kontaminaci tudíž musíme předpokládat vždy, pokud ji sami aktivně neodstraníme či nepředcházíme. Další možností je příprava čerstvého formaldehydu přímo z paraformaldehydu, tedy polymerizovaného formaldehydu (v takovém případě je koncentrace kyseliny mravenčí o řád nižší než u standardního 4% pufovaného formaldehydu) (Fox *et al.*, 1985).

Samotný mechanismus fixace formaldehydem spočívá ve vytváření intramolekulárního a intermolekulárního zesíťování. Nejčastějším jevem je vznik methylenového můstku mezi postranními řetězci aminokyseliny lysinu. K dalšímu zesíťování může docházet také mezi dalšími aminokyselinami a biomolekulami. Fixace

formaldehydem neovlivňuje sekundární a terciární strukturu proteinů a vzniklé zesíťování a funkce proteinů jsou vratné účinkem zvýšené teploty (Howat *et al.* Wilson, 2014).

2.1.2.1 Příprava FFPE bločků

Vzorky fixované formalínem a zalité do parafínu (tzv. FFPE bločky, z angl. formalin-fixed, paraffin-embedded) jsou tkáně, které prošly fixací ve formaldehydu, následně byly odvodněny (parafín není mísitelný s vodou) a napuštěny roztokem mísitelným s parafínem (obvykle xylen). Ten následně pomáhá parafínu prostupovat do tkáně. Takovýto bloček může být uchováván desítky let v pokojové teplotě bez výrazné degradace archivované tkáně. Samotné zalití vzorku do parafínu by nemělo mít výrazný vliv na kvalitu biomolekul. Nicméně doporučuje se použití parafínu tajícího při nižších teplotách, protože vysoká teplota by negativní vliv na kvalitu biomolekul mít mohla (Hewitt *et al.* 2008).

Protokolů, podle kterých tento proces probíhá je velmi mnoho a prakticky každé patologické či lékařsko-soudní pracoviště má svůj vlastní. Součástí této práce bylo také zjišťování protokolů na přípravu FFPE. Shrnutí informací získaných z protokolů je uvedeno v Příloze v Tabulce P1 a reprezentativní výběr těchto protokolů se nachází v Příloze v Tabulce P2.

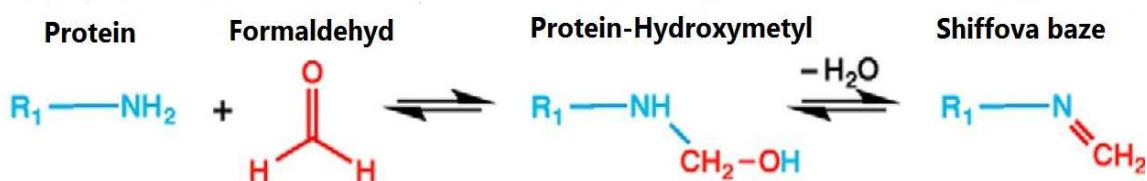
2.1.2.2 Formaldehyd a jeho působení na DNA

Pokud chceme tkáň fixovanou formaldehydem využít jako zdroj DNA, musíme vzít v úvahu, že formaldehyd s DNA chemicky reaguje, a tím ji negativně ovlivňuje. Konkrétně dochází ke změně primární sekvence, fragmentaci, zesíťování s biomolekulami a obecně ke zhoršení izolačních možností DNA. Z tohoto důvodu existují snahy nahradit formaldehyd moderními fixačními činidly, která by poskytly stejné histologické výsledky jako formaldehyd, ale zároveň by byly šetrnější k nukleovým kyselinám (Belloni *et al.*, 2013; Howat *et al.* Wilson, 2014; Staff *et al.*, 2013).

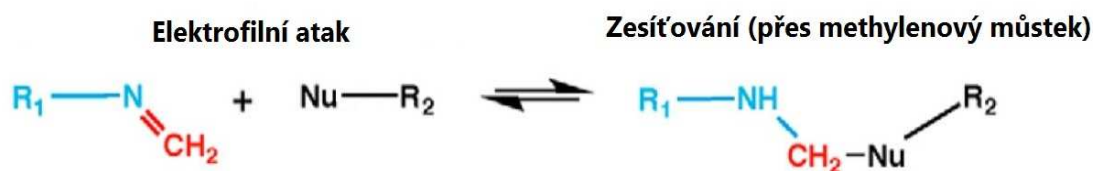
Existují čtyři typy chemických interakcí mezi formaldehydem a DNA. Vlivem prvních dvou dochází k zesíťování jednotlivých molekul či fragmentů DNA s DNA a proteiny. Molekula formaldehydu se nejdříve váže (mechanismem chemické adice) na dusík báze nukleové kyseliny, a vytváří tak hydroxymethylovou skupinu. Tato N-hydroxymethylová skupina následně elektrofilně atakuje další bázi nukleové kyseliny, a vytváří tak methylenový můstek mezi dvěma aminoskupinami dvou bazí. Obdobně vzniká methylenový můstek také mezi DNA a proteiny, jak je znázorněno na Obrázku 1. Formaldehyd dále způsobuje hydrolyzu N-glykosidické vazby, což vede k uvolňování

purinů a pyrimidinů z molekul DNA. V neposlední řadě pak formaldehyd způsobuje hydrolýzu fosfodiesterové vazby, a tím molekulu DNA štěpí na fragmenty (Douglas *et al.*, 1998; Srinivasan *et al.*, 2002).

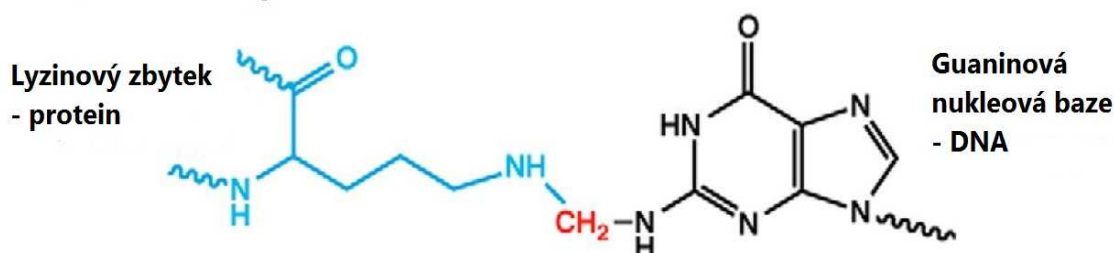
Krok 1



Krok 2



Příklad zesíťování proteinu a DNA



Obrázek 1: Chemické rovnice zesíťování proteinu s DNA účinkem formaldehydu. V prvním kroku se molekula formaldehydu váže na dusík aminoskupiny proteinu a tvoří hydroxymetylovou skupinu. Ta v druhém kroku elektrofilně atakuje molekulu nukleové kyseliny a tvoří methylenový můstek mezi dvěma molekulami (kovalentní vazba). Příkladem je zesíťování aminoskupiny lyzinu u proteinu s dusíkem guaninové nukleové báze u DNA. Převzato a upraveno z Hoffman *et al.*, 2015.

Nicméně je potřeba mít na paměti, že přestože výše popsanou degradaci DNA způsobuje formaldehyd sám o sobě, nemusí být nutně jejím jediným zdrojem. Jak je uvedeno v kapitole 2.1.2, formaldehyd se přeměňuje na kyselinu mravenčí. Kyselina mravenčí snižuje pH roztoku formaldehydu a toto nízké pH způsobuje hydrolytické degradační procesy, tedy uvolňování purinů a pyrimidinů z molekul DNA a štěpení fosfodiesterové vazby (Koshiha *et al.*, 1993; Williams *et al.*, 1999).

2.1.2.3 Faktory ovlivňující formaldehydovou fixaci ve vztahu k DNA

Negativní účinky formaldehydu na DNA mohou být do jisté míry ovlivněny nastavením podmínek, za kterých fixace probíhá. Jako hlavní faktory jsou nejčastěji uváděny délka fixace, teplota, během níž fixace probíhá, či chemické složení a pH použitého formaldehydu a v neposlední řadě je důležitý i typ tkáně, kterou fixujeme.

Jedním z faktorů, který hraje roli, je tkáň samotná. Tkáň s vyšší buněčnou proliferací jsou více postihovány negativními účinky fixace formaldehydem, jelikož replikující se DNA je obecně více náchylná ke škodlivému chemickému a fyzikálnímu působení (Dutta *et al.*, 2012; Khoja *et al.*, 2012).

Dalším faktorem je délka fixace formaldehydem. Výsledky studií ukazují, že čím déle působí formaldehyd na DNA, tím více dochází k jejímu zesíťování (Khoja *et al.*, 2012), což může způsobovat nižší kvalitu vyizolované DNA (Ferrer *et al.*, 2007). Delší působení formaldehydu na DNA však nevede pouze k vyšší míře fragmentace DNA a nižším výtěžkům, snáze také může docházet k změně primární struktury DNA (Karlsen *et al.*, 1994). V závislosti na typu následné analýzy a dalších podmínkách, jako je například velikost vzorku či způsob extrakce DNA z fixovaného vzorku, se tyto negativní účinky formaldehydu mohou projevit již po 6 hodinách fixace (Ben-Ezra *et al.*, 1991).

Teplota fixace je dalším faktorem. Standardně se fixace provádí za pokojové teploty (25 °C), nicméně bylo ukázáno, že fixace za nízké teploty (4 °C) poskytuje podstatně méně degradovanou DNA (Bussolati *et al.*, 2011; Tokuda *et al.*, 1990).

Posledním důležitým faktorem jsou chemické parametry formaldehydu. Tkáň fixované pufrovaným formaldehydem jsou lepším zdrojem nukleových kyselin než vzorky fixované formaldehydem, který pufrovaný není. Tato skutečnost se projevuje zejména u vzorků, které jsou ve formaldehydu fixovány po dlouhou dobu – až měsíce či roky. Pravděpodobně protože při použití nepufrovaného formaldehydu dochází k dlouhodobému přibývání kyseliny mravenčí v roztoku, a tudíž snižování pH roztoku, což významně přispívá k degradaci DNA. Pufrovaný formaldehyd je alespoň do určité míry schopný potlačovat změny v pH roztoku (Ferrer *et al.*, 2007; Greer *et al.*, 1991; Hewitt *et al.*, 2008; Thavarajah *et al.*, 2012).

2.2 Izolace DNA z FFPE bločků

Ačkoli vlivem fixace dochází k modifikaci a degradaci DNA, poskytují FFPE bločky materiál, z něhož lze provést extrakci nukleových kyselin. Úspěšná izolace DNA z FFPE

bločků za použití proteinázy K a dodecylsírany sodného (SDS, z angl. sodium dodecyl sulfát) byla poprvé popsána v roce 1985 (Goelz *et al.*, 1985). Bylo prokázáno, že takto získanou DNA je možné štěpit restrikcčními endonukleázami a následně hybridizovat s DNA sondami (Dubeau *et al.*, 1986; Goelz *et al.*, 1985)

Základní kroky extrakce DNA z FFPE bločků vycházející z původního protokolu dle Goelz *et al.* (1985) a Dubeau *et al.* (1986) se pro izolaci DNA používají dodnes. Existuje však zároveň mnoho variant a komerčních kitů, které umožňují získat co nejkvalitnější vzorek DNA v závislosti na jeho dalším využití (tabulka kitů vhodných pro izolaci DNA z FFPE bločků je uvedena v Příloze jako Tabulka P3).

2.2.1.1 Předextrakční ošetření FFPE tkáně

Podle původního protokolu je pro extrakci DNA nejprve nutné odstranit parafin, ve kterém byla tkáň zalita. Parafin může být odstraňován z celistvého bločku, vhodnější se však zdá být odstraňování parafínu z bločku, který se předem nařeže na tenké řezy (Dubeau *et al.*, 1986). Nejčastěji se k odstranění parafínu používá xylen, jenž parafin rozpouští a uvolňuje od tkáně. Pro dokonalé odstranění parafínu je nutné tento krok několikrát opakovat. Po odstranění parafínu xylenem je tkáň rehydratována pomocí série promývacích kroků v ethanolu (postupně je použit 100%, 70% a 50% ethanol) (Goelz *et al.*, 1985; Pikor *et al.*, 2011). K odstranění parafínu však mohou být využity i jiné přístupy než použití xylenu, např. použití minerálních olejů či mikrovln (Banerjee *et al.*, 1995; Lin *et al.*, 2009).

Existují také studie, které nepovažují odstranění parafínu za důležité, nebo jej nahrazují jinými postupy. Jedná se například o zahřátí tkáně uložené v FFPE bločcích, bez předchozího xylenu/ethanolového kroku, na teplotu 98 °C v pufru obsahujícím Tris či zahřátí na 120 °C v alkalickém roztoku. (Shi *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2002).

2.2.1.2 Extrakce DNA z FFPE bločků

Byla publikována celá řada metodických přístupů zabývajících se extrakcí a purifikací nukleových kyselin z FFPE bločků. Původní protokol izolace DNA dle Dubeau *et al.* (1986) byl založen na použití proteinázy K a SDS. Proteináza K se používá k štěpení enzymů a proteinů, jako jsou například nukleázy, které by mohly způsobit degradaci DNA. SDS slouží jako denaturační činidlo usnadňující štěpení tkáně, z níž se DNA uvolňuje. Následná purifikace DNA z tkáňového lyzátu byla provedena pomocí chloroform-izoamyl alkoholové extrakce, při které dochází k oddělení DNA a RNA do horní vodné fáze od lipidů, proteinů a polysacharidů, které zůstávají ve spodní organické fázi. V dalším kroku

byl vzorek inkubován s RNázou A a pronázou, aby se odstranila RNA a zbylé proteiny. K odstranění použitých enzymů a finální izolaci čisté DNA ze vzorku byla na závěr použita fenolová extrakce (Dubeau *et al.*, 1986; Pikor *et al.*, 2011).

Mezi základní modifikace původního protokolu izolace DNA z FFPE bločků patří zvýšení koncentrace proteinázy K, prodloužení času štěpení tkáně proteinázou K či zvýšení teploty před, během nebo po tomto kroku (Dedhia *et al.*, 2007; Duval *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2009). Některé studie však enzymatické štěpení tkáně zcela vynechávají a pro izolaci DNA z FFPE bločků doporučují pouze zahřátí vzorku na vysokou teplotu v alkalickém prostředí (Shi *et al.*, 2002). Podle autorů těchto studií by alkalický roztok a vysoké teploty měly vést k rozpadu buněčné a jaderné membrány a k odstranění zesíťování mezi DNA a proteiny. Na druhou stranu je třeba zmínit, že účinkem samotné vyšší teploty dochází k degradaci DNA, a proto je tento krok potřeba optimálně nastavit (Lindahl, 1993).

Mezi další modifikace původního protokolu patří úprava složení lyzačního pufru. Pro zvýšení výtěžků extrakce DNA lze přidat látky, které pomáhají odstranit zbytkový formaldehyd, jenž se uvolňuje během extrakce nukleových kyselin. Jedná se například o detergenty, jako je glycin (Shedlock *et al.*, 1997).

K odstranění použitých enzymů či jiných kontaminujících proteinů nemusí být použito pouze fenolové extrakce, ale proteiny mohou být ze vzorku odstraněny také vysolením, například saturevaným roztokem chloridu sodného (Howe *et al.*, 1997).

Další alternativu izolace DNA z FFPE bločků představuje metoda založená namísto na organické purifikaci na využití silikátových partikulí či kolonek nebo na polymerním materiálu, který odděluje DNA od degradačních enzymů a jiných kontaminujících látek (Boom *et al.*, 1990; Legrand *et al.*, 2002; Walsh *et al.*, 1991; Wickham *et al.*, 2000).

2.2.1.3 Post-extrakční úprava DNA izolované z FFPE bločků

Zcela jiný přístup optimalizace izolace DNA z FFPE bločků byl publikován v roce 2003. Jeho autoři Bonin a kol. před samotnou polymerázovou řetězovou reakcí (PCR; z angl. polymerase chain reaction) DNA vyizolované z FFPE tkáně nejprve zařadili před-PCR krok opravy DNA. Ten byl proveden pomocí Taq DNA polymerázy, která opravila jednořetězcové zlomy DNA, a tím došlo k získání delších DNA fragmentů pro samotnou PCR amplifikaci (Bonin *et al.*, 2003). Od té doby se na trhu objevilo několik kitů na před-PCR opravu poškozené DNA, nicméně jejich účinnost není vysoká a v některých případech jejich použití vede dokonce ke zhoršení následné amplifikovatelnosti (Robertson *et al.*, 2014).

2.2.1.4 Výhody a nevýhody jednotlivých postupů izolace DNA z FFPE bločků

Existuje mnoho studií zabývajících se srovnáním účinků jednotlivých variant protokolu izolace DNA z FFPE bločků. Tyto studie však často přinášejí rozdílné závěry. Na výsledek izolace DNA z FFPE vzorku má totiž značný vliv nejen zvolená izolační metoda, ale také mnohé parametry spojené s původní fixací vzorku, jako druh tkáně, kvalita provedení fixace či délka a podmínky skladování daného vzorku (viz kapitola 2.1.1). Dalším významným faktorem v hodnocení účinnosti izolace DNA z FFPE bločků je parametr, který pro hodnocení použijeme. Některé metody například přinášejí lepší výtěžky DNA, jiné výrazně zlepšují čistotu DNA, další postupy mohou být šetrnější, a tím zajistit izolaci delších fragmentů DNA. Je tedy potřeba brát ohled na to, k čemu vyizolovanou DNA budeme dále požívat a které z kritérií je pro nás klíčové.

Některé srovnávací studie považují za kritický krok izolace DNA z FFPE bločku odstranění parafínu (Sengüven *et al.*, 2014), jiné naopak tento krok nepovažují za nezbytný, neboť nepřináší žádný benefit (Gilbert *et al.*, 2007).

Jako jednoznačně výhodné se jeví zařazení delšího inkubačního času při štěpení vzorku proteinázou K, a to až na 48–72 hodin. V důsledku prodloužení lyzačního kroku dochází k lepší amplifikovatelnosti DNA v PCR reakci, zároveň ale nedochází k zvýšení množství vyizolované DNA. Zdá se tedy, že prodloužení času štěpení vzorku činí DNA více vhodnou pro následnou PCR reakci, pravděpodobně odstraněním zesíťování DNA (Gilbert *et al.*, 2007). Nicméně jiné studie zkoumající vliv delšího inkubačního času během štěpení tkáně z FFPE bločků zaznamenaly i vyšší výtěžky DNA, pravděpodobně se tak v rámci pozitivního vlivu na izolaci DNA uplatňují oba mechanismy (Paireder *et al.*, 2013; Sengüven *et al.*, 2014). Podobně výhodné se zdá být i použití vyšší teploty během lyzování vzorku, maximálně však 65 °C, neboť vyšší teploty již pravděpodobně vedou k degradaci DNA, a tím k získání nižších výtěžků DNA ze vzorku (Gilbert *et al.*, 2007; Paireder *et al.*, 2013). Lepší výtěžky a amplifikovatelnost DNA byly zaznamenány také při zahřátí vzorku na vysokou teplotu (95 °C), ale až po jeho lyzování (Dedhia *et al.*, 2007).

Naopak ne zcela jednoznačně pozitivní vliv mělo zařazení předextrakčního zahřátí FFPE bločku na vysokou teplotu (okolo 98 °C) či použití protokolu založeném na izolaci DNA za vysoké teploty (100–120 °C) v alkalickém prostředí. Ačkoli obě modifikace vedly k zisku dobře amplifikovatelné DNA v následné PCR reakci, u obou metod došlo k negativnímu ovlivnění jiných parametrů. V případě zařazení předextrakčního zahřátí

došlo k snížení účinnosti multiplexové PCR (snížený počet amplifikovaných lokusů) a v případě izolace DNA účinkem vysoké teploty v alkalickém prostředí došlo k snížení množství vyizolované DNA (Gilbert *et al.*, 2007).

Ve srovnávacích studiích přineslo jednoznačně negativní účinek na amplifikovatelnost DNA v PCR reakci přidání glycinu do lyzačního pufru použitého na izolaci DNA (Gilbert *et al.*, 2007).

Dobrých výsledků bylo dosaženo použitím komerčních kitů na izolaci DNA z FFPE tkáně založených na silikátových kolonkách, konkrétně QIAamp DNA izolačních kitů od výrobce Qiagen. Jejich použitím byla získána dobře amplifikovatelná DNA a lepších výsledků bylo dosaženo také v multiplexové PCR reakci (Gilbert *et al.*, 2007; Sengüven *et al.*, 2014). Použití komerčního kitu bylo také nejvhodnější variantou v případě izolace DNA z dlouhodobě (více než 50 let) skladovaných vzorků (Paireder *et al.*, 2013). Ze závěrů jiné studie se optimální metodou pro izolaci a purifikaci DNA zdá být kombinace komerčního QIAamp DNA kitu spolu s fenol-chloroformovou extrakcí. Fenol-chloroformový krok pravděpodobně zajišťuje odstranění kontaminací, které by mohly negativně ovlivnit schopnost DNA vázat se na silikátovou matrix, a zároveň obě metody pravděpodobně zajišťují odstranění případných inhibitorů následné PCR reakce ze vzorku (Farrugia *et al.*, 2010).

Post-extrační oprava DNA pomocí Taq DNA polymerázy přinesla výrazné zlepšení amplifikovatelnosti DNA v PCR reakci, ačkoli zároveň nebyly detekovány významné změny ve velikosti fragmentů DNA. Zdá se tedy, že tento před-PCR opravný krok umožní opravy pouze drobných poškození DNA nikoli výrazných defektů DNA, jako představuje fragmentace DNA. Zároveň je třeba uvést, že studie se nezabývají potenciální možností vzniku chyb v sekvenci DNA, která by při opravě DNA v tomto kroku mohla vzniknout (Gilbert *et al.*, 2007). Další studie naznačují, že přístupem, který by mohl zvýšit amplifikovatelnost menších fragmentů poškozené DNA je prosté přidání vhodných aditiv do PCR reakce (Robertson *et al.*, 2014).

2.3 Stanovení kvality DNA vyizolované z FFPE bločků

Kvalita DNA vyizolované z FFPE bločků může být posuzována na základě různých kritérií, jako je množství, čistota, integrita či amplifikovatelnost DNA v průběhu PCR reakce. Pro ohodnocení uvedených parametrů jsou vhodné různé metody, ideálně potom jejich kombinace, neboť jednotlivé metody často nepodávají dostatečně komplexní

informaci o kvalitě získané DNA. Porovnání jednotlivých metod používaných pro stanovení vlastností DNA je uvedeno v Tabulce 1, zařazené na konec této kapitoly.

Určení kvality DNA nám umožňuje vybrat vhodný metodický přístup v dalším analyzování DNA vzorku. Například stanovení míry fragmentace DNA je důležité pro následný výběr vhodné metody určení profilu DNA pro identifikační účely. K tomuto účelu se standardně používá detekce tandemových opakování na DNA, tzv. STR (z angl. short tandem repeats). Avšak bylo ukázáno, že pro vysoce fragmentovanou DNA (fragmenty kratší než 200 bp) je vhodnější detekce mini-STR nebo jednonukleotidových polymorfismů, tzv. SNP (z angl. single nucleotide polymorphism), u detekce SNP je ale potřeba vzít v úvahu, že u tkání s delším posmrtným intervalem (PMI, post mortem interval) může docházet k modifikaci bazí, což má zásadní vliv na výsledek analýzy (Alaeddini *et al.*, 2010; Hughes-Stamm *et al.*, 2010).

2.3.1 Spektrofotometrické metody

Spektrofotometrického měření lze využít k určení koncentrace a čistoty vyizolované DNA. Koncentraci lze spektrofotometricky určit řádově v $\mu\text{g/ml}$ a stanovení je založeno na měření absorbance při 260 nm (absorbční maximum pro DNA). Pro převod hodnot absorbance na koncentraci DNA je využito Lambert-Beerova zákona. Absorbance o hodnotě 1 při měření v 1 cm kyvetě odpovídá přibližně koncentraci 50 $\mu\text{g/ml}$ dvouřetězcové DNA. K absorbanci při 260 nm přispívá jednořetězcová i dvouřetězcová DNA, ale také RNA, která se vyskytuje ve vzorku, proto není takto stanovená koncentrace DNA zcela přesná. Absorbance při 320 nm by měla sloužit jako kontrolní měření, neboť DNA neabsorbuje UV světlo této vlnové délky (Santella, 2006).

Spektrofotometrického měření lze využít také k určení čistoty vyizolované DNA. K stanovení kontaminace proteiny nebo RNA se používá poměr absorbancí při 260 nm a 280 nm (A_{260}/A_{280}) pro určení kontaminace organickými látkami poměr absorbancí při 260 nm a 230 nm (A_{260}/A_{230}). Čistá DNA má hodnotu A_{260}/A_{280} rovnou 1,8, jako akceptovatelné hodnoty se udává A_{260}/A_{280} v rozmezí 1,8–2. Vyšší hodnoty ukazují na kontaminaci RNA, nižší hodnoty potom na kontaminaci proteiny. Akceptovatelný poměr A_{260}/A_{230} se udává v rozmezí 1,8–2, nižší hodnoty ukazují na kontaminaci organickými látkami. (Gallagher, 2001).

Vzorek DNA izolované z fixované tkáně bývá často alespoň částečně zesíťován s proteiny a vlivem izolačních procedur nezřídka obsahuje další látky a enzymy, a proto je

obecně stanovení koncentrace a čistoty pomocí spektrofotometrie obtížné (Ahn *et al.*, 1995).

2.3.2 Fluorometrické metody

Fluorometrického stanovení koncentrace DNA se využívá v případě, že vzorek obsahuje velmi malá množství DNA. Citlivost metody umožňuje detekovat koncentrace DNA pohybující se řádově v ng/ml – pg/ml. Metoda je založena na měření fluorescence generované v případě inkorporace fluorescenční barvy do dvouřetězcové DNA. Z toho také plyne, že tento přístup umožňuje detekovat pouze dvouřetězcové molekuly DNA. Koncentrace DNA ve vzorku se stanovuje vzhledem ke kalibrační křivce tvořené z definovaných koncentrací DNA. Na rozdíl od spektrofotometrie však fluorometrické metody nepřinášejí informaci o čistotě získané DNA (Santella, 2006).

Mezi původně používané barvy patřil Hoechst 33258 a ethidium bromid. Nevýhodou použití Hoechstu 33258 je skutečnost, že se preferenčně váže do A-T bohatých oblastí DNA. V případě ethidium bromidu nevýhodou představuje fakt, že se může vázat i na jednořetězcovou DNA a RNA (Gallagher, 2001).

V dnešní době patří mezi nejvyužívanější látky fluorescenční barva SYBR Green či PicoGreen. Jejich výhodou je, že po vazbě na DNA dochází k výrazné změně jejich fluorescenčních vlastností, pozadí měření (dané nenavázanou barvou přítomnou ve vzorku) je tudíž velmi nízké, dále jsou stabilní vůči vysvěcování, selektivně se váží na dvouřetězcovou DNA a kontaminace vzorku (jako jednořetězcová DNA, RNA či fenol) nemají na jejich vazbu vliv (Ahn *et al.*, 1995).

2.3.3 Elektroforetické metody

Jednoznačnou výhodou použití elektroforetických metod při hodnocení kvality DNA získané z FFPE bločků je informace o integritě této DNA. K elektroforetickému stanovení integrity DNA se využívá migrace vzorku DNA v agarózovém gelu umístěném v elektrickém poli. Vzhledem k tomu, že DNA obsahuje negativně nabitě fosfátové skupiny, dochází po umístění DNA do elektrického pole k její migraci směrem ke kladnému pólu. Během migrace je celkový DNA vzorek v gelu rozdělen na jednotlivé fragmenty v závislosti na jejich velikosti. Vizualizace jednotlivých fragmentů barvou, která se váže na DNA (například ethidium bromid či jiná fluorescenční barva), poté poskytne informaci o míře fragmentace DNA.

Tradiční agarózové gely jsou vhodné pro analýzu fragmentů DNA v rozmezí 0,5–25 kb pro analýzu menších fragmentů je vhodnější polyakrylamidová elektroforéza. V závislosti na velikosti fragmentů se používá nejčastěji 0,5–1,5% agaróza (Lee *et al.*, 2012; Voytas, 2001).

Analýza DNA v agarózovém gelu také umožňuje stanovení množství DNA. To může být určeno na základě porovnání intenzity vizualizovaného analyzovaného vzorku DNA s intenzitou vizualizovaného standardu DNA, který však musí mít stejnou délku jako analyzovaná DNA. Přesnější výsledky poskytuje denzitometrické měření intenzity vizualizovaného analyzovaného vzorku DNA a následné porovnání s kalibrační křivkou tvořenou DNA o známých koncentracích. Tímto přístupem lze určit nejlépe množství DNA pohybující se mezi 20 ng až 100 ng (Dorfman *et al.*, 2013; de Jong *et al.*, 2011).

V dnešní době však existují i alternativní přístupy založené na elektroforetickém měření, které poskytují informaci nejen o stupni degradace vyizolované DNA, ale zároveň také jednoduše a přesně stanovují její koncentraci. Jedná se o DNA elektroforézu založenou na čípech, které jsou tvořeny skupinou mikrokanálek, do nichž je umístěn vzorek analyzované DNA. Podobně jako u klasické agarózové elektroforézy je DNA elektroforeticky rozdělena na jednotlivé fragmenty na základě jejich velikosti. Největší výhodou čipové elektroforézy je, že k měření stačí velmi malé množství vzorku (až 1 µl o koncentraci DNA řádově ng/ml) a poskytuje značně komplexní informaci o kvalitě DNA (Dorfman *et al.*, 2013; Mueller *et al.*, 2000; Woolley *et al.*, 1994).

2.3.4 Metody založené na PCR

2.3.4.1 Princip kvantitativní PCR

Kvantitativní PCR (qPCR, z angl. quantitative polymerase chain reaction; označovaná také jako real-time PCR) se od klasického PCR liší především v odečítání informací. Zatímco klasická PCR podává informace pouze o konečném stavu reakce, qPCR umožňuje sledovat její průběh. qPCR totiž kombinuje klasické amplifikování DNA spolu s měřením odpovídajícího nárůstu fluorescence pomocí fluorescenčních sond či barev. Cyklus, ve kterém dojde k překročení stanovené míry fluorescence, nese označení Ct (cycle-threshold). Porovnáním Ct jednotlivých vzorků DNA s hodnotou Ct známého množství referenční DNA lze stanovit množství DNA v původním vzorku. Takto však lze stanovit pouze DNA, kterou je možné amplifikovat. Nižší hodnoty Ct naznačují vyšší množství amplifikovatelného templátu DNA (Gilbert *et al.*, 2007).

Příkladem často používaných fluorescenčních sond jsou TaqMan sonda a fluorescenční barva SYBR Green I. V případě TaqMan sondy neboli hydrolytické sondy nazýváme sondou oligonukleotid (nikoliv nutně viz Braasch *et al.* Corey, 2001), který má k sobě kovalentně připevněn reportérový fluorofor a jeho zhášec. Reportérový fluorofor je připevněn k 5' konci a zhášec je připevněn k 3' konci oligonukleotidu. Takovéto umístění zaručuje jejich vzájemnou blízkost a umožňuje zhášeci neustále snižovat fluorescenční intenzitu reportérového fluoroforu. Tento proces se nazývá fluorescenční rezonanční přenos energie (z angl. fluorescence resonance energy transfer, FRET) (Stryer, 1978). Sonda má takovou primární nukleotidovou strukturu, aby nasedala na námi zvolenou sekvenci cílové molekuly DNA, kterou kvantifikujeme. Tuto cílovou sekvenci ohraničíme primery. Metoda využívá 5'→3' exonukleázovou aktivitu některých polymeráz (především Taq polymerázy). Ne všechny polymerázy s 5'→3' exonukleázovou aktivitou jsou však pro tuto metodu vhodné (Kreuzer *et al.*, 2000). Poté, co primery a sonda nasednou na cílovou sekvenci, nasedá přes primery polymeráza a syntetizuje nové vlákno DNA. Vzhledem k tomu, že mezi primery se nachází nasednutá sonda, je tato polymerázou odstraněna (oligonukleotid je hydrolyzován na samostatné nukleotidy) a na ni připevněný reportérový fluorofor se zhášecem se od sebe vzdálí a je-li reportérový fluorofor excitován, je schopen vyzařovat signál do okolí (tento není pohlcován zhášecem). Zaznamenání tohoto signálu značí přítomnost cílové molekuly, síla signálu pak vyjadřuje množství takové molekuly. Jako reportérový fluorofor se používá například FAM (6-carboxyfluorescein), JOE (2,7-dimethoxy-4,5-dichloro-6-carboxyfluorescein) či TET (tetrachloro-6-carboxyfluorescein). TAMRA (6-carboxytetramethylrhodamin) se používá jako zhášec (Gibson *et al.*, 1996; Heid *et al.*, 1996; Holland *et al.*, 1991).

TaqMan sondy mohou být navíc modifikovány. Modifikace sond slouží především k změnám teploty tání a teploty nasedání primerů. Změníme-li totiž afinitu oligonukleotidové kostry primeru k cílové sekvenci (bez změny samotné sekvence), můžeme volněji upravovat délku primeru, a tím jeho teplotu tání a teplotu nasedání. Tyto modifikace například zahrnují spojení oligonukleotidu s chemickou skupinou silně vázající malý žlábek DNA dvoušroubovice (Kutyavin *et al.*, 2000) či chemicky syntetizovanou peptidovou nukleovou kyselinou (PNA, z angl. peptide nucleic acid), která nahrazuje samotnou fosfodiesterovou kostru DNA a která má k DNA větší afinitu než DNA samotná (Kubista *et al.*, 2006).

SYBR Green I (N',N'-dimethyl-N-[4-[(E)-(3-methyl-1,3-benzothiazol-2-yliden)methyl]-1-phenylquinolin-1-ium-2-yl]-N-propylpropan-1,3-diamin) je látka, která

má výrazné fluorescenční vlastnosti pouze při interakci s dvouřetězcovou molekulou DNA, a její detekovatelná fluorescence se tedy zvyšuje s celkovým množstvím dvouřetězcové DNA. Jedná se o nespecifický fluorofor, tato metodika tudíž nevyžaduje žádnou konkrétní sekvenci (nicméně nespecifičnost není absolutní (Zipper *et al.*, 2004)) s výhodou, že jeho samotné použití je velmi triviální (Simpson *et al.*, 2000). Nevýhodou je však právě zmíněná nespecifičnost, kdy se fluorescence vzorku zvyšuje nespecifickými PCR produkty i pouhými primerovými dimery. Nicméně tyto problémy jsou kontrolovatelné (Ririe *et al.*, 1997).

2.3.4.2 Stanovení kvality DNA pomocí qPCR

Ke kvantifikaci DNA pomocí qPCR je na molekule DNA nutno vybrat správné cílové sekvence pro kvantifikační primery a (případnou) oligonukleotidovou sondu. Cílové sekvence musí být specifické pro lidskou DNA, aby nedocházelo k interferencím v případě smíšených vzorků. Zároveň by cílová sekvence měla být co nejméně variabilní kvůli univerzálnosti užití. Sekvence by též měla být rozumně krátká, s přihlédnutím k možnostem systému (použitá polymeráza, případná kontaminace apod.). V neposlední řadě jsou výhodné takové sekvence DNA, jejichž lokusy se v lidském genomu nacházejí ve vyšším počtu. Příkladem takovýchto sekvencí jsou: *Alu* sekvence, STR sekvence či lidský gen *RBI* (human retinoblastoma susceptibility gene). Citlivost této metody je v některých případech až 1 pg či 1 až 100 molekul DNA. Kvantifikace se dá provádět v několika nastaveních. Může probíhat v součinnosti s určováním míry degradace molekul DNA, může speciálně určovat množství přítomné mužské DNA (sekvence na Y chromozomu) nebo můžeme určovat množství mitochondriální DNA (používá se v případě nedostatečné genomické DNA) (Andréasson *et al.*, 2002; Hudlow *et al.*, 2008; Nicklas *et al.*, 2003; Walker *et al.*, 2003).

Úpravou nastavení PCR lze zjistit stupeň fragmentace molekul DNA a délku amplifikovatelných fragmentů. V tomto případě se využívá tzv. multiplex PCR. Tato metoda je založená na použití dvou a více dvojic primerů pro amplifikaci ampliconů o různých délkách, ty se mohou lišit o desítky (Hudlow *et al.*, 2008) až stovky párů bazí (Deagle *et al.*, 2006). Stupeň fragmentace DNA se následně určuje z poměru zastoupení amplifikovaných sekvencí, vyšší poměr ve prospěch kratších sekvencí přitom ukazuje na vyšší míru degradace DNA (Swango *et al.*, 2006).

Průběh reakce pak nepřímě vypovídá o čistotě vzorku, poněvadž některé látky použité pro fixaci nebo následnou izolaci DNA působí jako inhibitory PCR (Gilbert *et al.*, 2007).

V případě, že stanovujeme kvalitu DNA z FFPE bločků, je potřeba mít na paměti, že tyto vzorky často nejsou zcela vhodné. Vliv na PCR analýzu DNA vyizolované z FFPE bločku mají především následující skutečnosti popsané výše v textu. Za prvé, nukleové kyseliny jsou v důsledku fixování tkáně formaldehydem výrazně modifikovány (především se jedná o zesíťování DNA s proteiny). Za druhé, v analyzovaném vzorku mohou být přítomny látky, které inhibují amplifikaci DNA (například formalín). Za třetí, je zde možnost kontaminace vzorku během izolace DNA.

Tabulka 1: Porovnání metod určování kvality DNA. Tabulka shrnuje metodické přístupy na měření kvality DNA a jejich limitace.

| | | Metody | | | | |
|-----------------------|--------------------|---------------------|--------------------|------------------|--------------------------------|--------------------|
| | | Spektrofotometrické | Fluorometrické | Elektroforetické | Elektroforetické (čip) | PCR |
| Stanovovaná vlastnost | Množství | > 5 µg/ml | 25 pg/ml – 1 µg/ml | 20 – 100 ng | 5 – 500 pg/µl a 0,1 – 50 ng/µl | < 25 pg |
| | Čistota | Lze | Nelze | Nelze | Nelze | Lze (inhibice PCR) |
| | Stupeň fragmentace | Nelze | Nelze | Lze | Lze | Lze (amplikon) |
| | Amplifikovatelnost | Nelze | Nelze | Nelze | Nelze | Lze |

3 Materiál a metody

3.1 Materiál

3.1.1 Přístroje

Bioanalyzátor Agilent 2100, Agilent Technologies, USA

Centrifuga 5415 R, Eppendorf, Německo

Centrifuga MiniSpin, Eppendorf, Německo

DNA analyzátor ABI PRISM 310 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, USA

Koncentrátor Concentrator 5301, Eppendorf, Německo

Laboratorní lednice kombinovaná s mrazákem Mediline, Liebherr, Německo

Laboratorní mrazák Mediline, Liebherr, Německo

Laboratorní váhy KERN 572-31, KERN & SOHN, Německo

PCR cyklér Mastercycler nexus gradient, Eppendorf, Německo

Pracovní stanice Ultraviolet sterilizing PCR workstation, UVP, USA

Real Time PCR cyklér Mastercycler system ep realplex, Eppendorf, Německo

Spektrometr BioSpectrometer, Eppendorf, Německo

Štítkovač BMP 51, Brady, USA

Třepačka Thermomixer Comfort, Eppendorf, Německo

Vortex PV-1, Grand Instruments, Velká Británie

Vortex V-1, Biosan, Litva

3.1.2 Použité chemikálie

DNA standard pro qPCR SRM 2372 Human DNA Quantitation Standard, NIST, USA

DNAgard Tissue, Biomatrix, USA

Ethanol (EtOH) absolutní p.a., PENTA, ČR

Formaldehyd 36% (v/v) nepufrovaný (39% w/v) AnalaR Normapur, BDH Prolabo, USA

Formaldehyd 4% (v/v) pufrovaný (formol) Qpath, Labonord SAS, Francie

Formamid Hi-Di (highly deionized), Life Technologies, USA

Chlorid hořečnatý (MgCl₂) ve formě 50 mM roztoku, Bio-Rad, USA

Kit na fluorometrické stanovení koncentrace DNA – Qubit dsDNA HS Assay Kit, Invitrogen, USA

Kit na stanovení koncentrace DNA na Bioanalyzáru Agilent 2100 – Agilent High Sensitivity DNA kit, Agilent Technologies, USA

Kit na izolaci DNA – ZR Genomic DNA Tissue Microprep, Zymo Research, USA

Kit na PCR amplifikaci STR – AmpFLSTR NGM SElect, Applied Biosystems, USA

Kyselina mravenčí (HCOOH) 98%, Lach-Ner, ČR

SYBR Green – iQ SYBR Green Supermix, Bio-Rad, USA

Vnitřní standard pro SRT analýzu – GeneScan 600 LIZ Size Standard v 2.0, Life Technologies, USA

Voda (H₂O) pro PCR (tzv. PCR-grade), Promega, USA

Voda destilovaná (dH₂O), Nemocnice Na Bulovce, ČR

3.1.3 Tkáně

Tkáně byly odebírány se souhlasným stanoviskem Etické komise 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze a FN Motol k provádění experimentů s tkáněmi zemřelých osob ze dne 2.9.2014 (č.j.: EK 1235/14).

Vzorky lidské tkáně byly získány od MUDr. Tomáše Vojáčka z pracoviště Nemocnice Na Bulovce, Oddělení soudního lékařství. Byly provedeny celkem 4 fixační procedury (3.2.1, 3.2.2) s těmito tkáněmi:

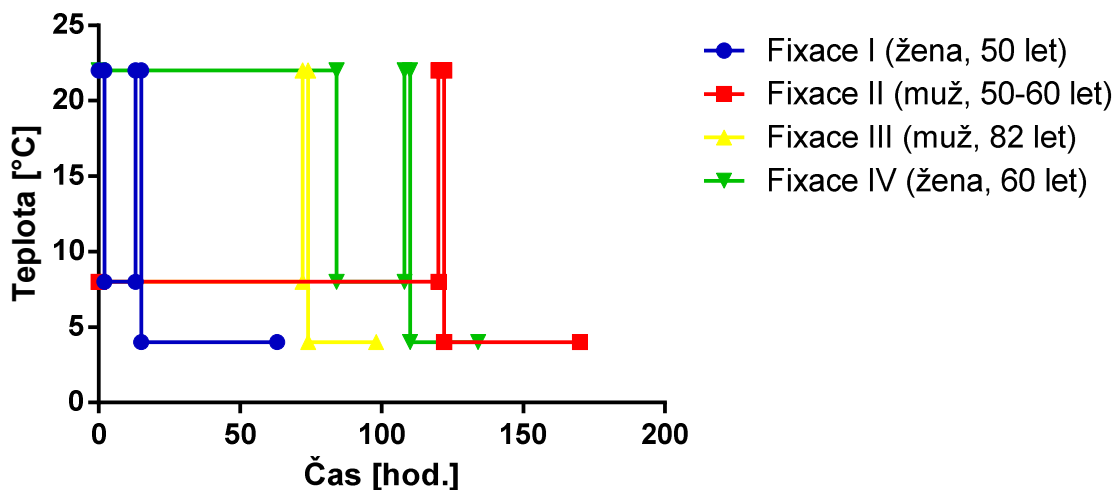
Fixace I: (žena, 50 let, posmrtný interval (PMI) 63 hod.; teplotní profil: 2 hod. RT; 11 hod. 6–10 °C; 2 hod. RT; 48 hod. 4 °C) plíce, srdce, slezina, ledvina, sval;

Fixace II: (muž, 50–60 let, PMI 7 dní; teplotní profil: 5 dní 6–10 °C; 2 hod. RT; 48 hod. 4 °C) srdce, ledvina, sval, játra, srdce ošetřené v roztoku DNAgard Tissue (Biomatrix, USA) (3.1.2) po dobu 24 hod. před fixací;

Fixace III: (muž, 82 let, PMI 4 dny; teplotní profil: 3 dny 6–10 °C; 2 hod. RT; 24 hod. 4 °C) srdce, ledvina, sval, játra;

Fixace IV: (žena, 60 let, PMI 5–6 dní; teplotní profil: 3–4 dny RT, 1 den 6–10 °C; 2 hod. RT; 24 hod. 4 °C) srdce, ledvina, sval, játra.

Graf s teplotními profily v průběhu PMI je znázorněn na Obrázku 2.



Obrázek 2: Graf s teplotními profily v průběhu PMI.

3.1.4 Roztoky

Fixační roztok 4NF (4% nepufrovaný formaldehyd)

| | |
|-----------------------------|------------------------|
| Formaldehyd 36% nepufrovaný | 11,10 % (v/v) |
| dH ₂ O | doplnit do 100 % (v/v) |

Fixační roztok 4PF (4% pufrovaný formaldehyd)

| | |
|--------------------------|-------------|
| Formaldehyd 4% pufrovaný | 100 % (v/v) |
|--------------------------|-------------|

Fixační roztok 36NF (36% nepufrovaný formaldehyd)

| | |
|-----------------------------|-------------|
| Formaldehyd 36% nepufrovaný | 100 % (v/v) |
|-----------------------------|-------------|

Fixační roztok 4PF+K (4% pufrovaný formaldehyd s 4% kyselinou mravenčí)

| | |
|--------------------------|------------------------|
| Kyselina mravenčí 98% | 4,08 % (v/v) |
| Formaldehyd 4% pufrovaný | doplnit do 100 % (v/v) |

qPCR reakční směs

| | |
|--|----------|
| 2X SYBR Green (Bio-Rad, USA) | 7,5 µl |
| MgCl ₂ (50mM) | 0,15 µl |
| Primer forward (10µM) | 0,075 µl |
| Primer reverse (10µM) | 0,075 µl |
| Cílová DNA | 1 µl |
| H ₂ O (o čistotě pro PCR, tzv. PCR-grade) | 6,2 µl |

3.1.5 Primery pro kvantifikaci pomocí qPCR

Primery byly nasyntetizovány firmou VBC-Biotech Service (Rakousko). Sekvence primerů byly následující:

Alu1 (jako forward primer): 5'-TGGTGGCTCACGCCTGTAA

Alu2 (jako reverse primer): 5'-CGATCTCGGCTCACTGCAA

Alu4 (jako reverse primer) 5'-CTCGTGATCCGCCCCGCCTC

Alu5 (jako forward primer): 5'-GGGCGCGGTGGCTCAC

Primery Alu1 + Alu2 tvoří produkt o velikosti 229 bp.

Primery Alu4 + Alu5 tvoří produkt o velikosti 63 bp.

3.2 Metody

3.2.1 Fixace I

Z orgánů pocházejících z mrtvého lidského těla (3.1.3) byla oddělena malá část tkáně (odebíraná část tedy nepocházela z homogenizovaného vzorku daného orgánu) a ta byla následně umístěna na 48 hod. do chladicího boxu (4 °C). Poté byla tkáň naložena do fixačních roztoků 4PF, 4NF, 36NF, 4PF+K (3.1.4), kde byla ponechána po dobu 1 hod. a 46 hod. Po vyjmutí tkáně z fixačního roztoku následoval proces odmytí fixačního roztoku (probíhající při pokojové teplotě; RT z angl. room temperature) složený z následujících kroků: jednorázové promytí v destilované vodě, 30 min. inkubace v destilované vodě za občasného promíchání a dvakrát promytí v destilované vodě. Po odmytí fixačního roztoku ihned následovala izolace DNA (3.2.4). Zpracování fixované tkáně bylo prováděno vždy v duplikátu (vzorek A a B). Jako kontrola sloužila tkáň nefixovaná a zmražená na -20 °C.

3.2.2 Fixace II, Fixace III a Fixace IV

Z orgánů pocházejících z mrtvého lidského těla (3.1.3) byla oddělena malá část tkáně (odebíraná část tedy nepocházela z homogenizovaného vzorku daného orgánu) a ta byla následně umístěna na 48 hod. do chladicího boxu (4 °C). Poté byla tkáň naložena do fixačních roztoků 4NF, 4PF, 36NF, 4PF+K (3.1.4). Ve fixačních roztocích byla tkáň ponechána po dobu 1 hod., 22 hod. a 46 hod. Po vyjmutí tkáně z fixačního roztoku následoval proces odmytí fixačního roztoku (probíhající při RT) složený z následujících kroků: 1 min. promývání pod tekoucí vodovodní vodou, 10 min. inkubace ve vodovodní vodě, 5 min. promývání pod tekoucí vodovodní vodou, 10 min. inkubace ve vodovodní

vodě a 1 min. promývání pod tekoucí vodovodní vodou. Po odmytí fixačního roztoku ihned následovalo odvodnění a zavodnění fixované tkáně (3.2.3)

Ve vybraných případech (3.1.3) byla tkáň před samotnou fixací inkubována 24 hod. v roztoku DNAgard Tissue (Biomatrica, USA) při RT. Zpracování fixované tkáně bylo prováděno vždy v duplikátu (vzorek A a B). Jako kontrola sloužila tkáň nefixovaná a zmražená na -20 °C (Fixace II – po 6 dní, Fixace III – po 2 dny, Fixace IV – po 2 dny).

3.2.3 Odvodnění a zavodnění fixované tkáně (u Fixace II, Fixace III a Fixace IV)

Po fixaci a promytí byla tkáň okamžitě odvodněna a následně ihned zavodněna. Odvodnění a zavodnění probíhalo zvyšující se a snižující se alkoholovou řadou. Veškeré přidávané objemy alkoholu byly cca 1 ml, výměny roztoků probíhaly prostým odlitím. Celý proces probíhal při RT a sestával z následujících kroků: dvakrát 5 min. inkubace za lehkého třepání v 75% ethanolu, dvakrát 5 min. inkubace za lehkého třepání v 95% ethanolu, 30 min. inkubace za lehkého třepání v 100% ethanolu, dvakrát 5 min. inkubace za lehkého třepání v 95% ethanolu, dvakrát 5 min. inkubace za lehkého třepání v 75% ethanolu. Na závěr byl ethanol důkladně odstraněn a tkáň byla 5 min. inkubována za lehkého třepání ve vodě určené pro použití v molekulární biologii. Ta byla poté důkladně odstraněna a ihned následovala izolace DNA (3.2.4).

3.2.4 Izolace DNA

Štěpení fixované tkáně bylo prováděno pomocí kitu ZR Genomic DNA Tissue Microprep (Zymo Research, USA), který obsahoval 2X Digestion Buffer a proteinázu K (přibližně 20 mg/ml). K fixované, promyté a odvodněné/zavodněné tkáni bylo přidáno 15 µl proteinázy K, 142,5 µl 2X Digestion Buffer a 142,5 µl vody pro PCR. Roztok s tkání byl zvortexován a intenzivně třepán (750 rpm) při 55 °C přes noc (cca 16–18hod.).

Na izolaci DNA ze štěpené tkáně byl použit kit ZR Genomic DNA Tissue Microprep (Zymo Research, USA), který obsahoval: Genomic Lysis Buffer, kolonku Zymo-Spin IC Column, pre-Wash Buffer, g-DNA Wash Buffer a DNA Elution Buffer. Ke štěpenému vzorku (rozštěpená tkáň, 15 µl proteinázy K, 142,5 µl vody pro PCR, 142,5 µl 2X Digestion Buffer) bylo přidáno 1 050 µl roztoku Genomic Lysis Buffer. Směs byla řádně promíchána a centrifugována (10 000 x g, 1 min.). Supernatant byl následně přenesen na kolonku Zymo-Spin IC Column a centrifugován (10 000 x g, 1 min.). Poté

bylo k vzorku na kolonci přidáno 200 µl roztoku DNA pre-Wash Buffer a kolonka byla centrifugována (10 000 x g, 1 min.). Následně bylo k vzorku na kolonci přidáno 400 µl roztoku g-DNA Wash Buffer a kolonka byla opět centrifugována (10 000 x g, 1 min.). Nakonec byl DNA vzorek eluován: na kolonku bylo nanášeno 100 µl DNA Elution Buffer, kolonka byla ponechána 5 minut při RT a následně centrifugována 1 min. na maximální rychlost (16 100 x g).

3.2.5 Stanovení koncentrace a míry fragmentace DNA kvantitativní polymerázovou řetězovou reakcí (qPCR)

Metoda qPCR byla použita pro stanovení koncentrace a fragmentace vyizolované DNA. K tomuto účelu bylo využito čtyř primerů (3.1.5) kombinovaných do dvou párů amplifikujících lidské repetitivní Alu sekvence. Nastavení použitých qPCR programů je uvedeno v Tabulce 2. Na konci každé qPCR analýzy bylo provedeno měření efektivity reakce, tzv. melting curve analysis. Jeho nastavení je uvedeno v Tabulce 3.

Tabulka 2: Použité qPCR programy.

| qPCR program | Alu1 + Alu2 | | Alu4 + Alu5 | |
|-----------------------------|-------------|--------|-------------|--------|
| krok | teplota | čas | teplota | čas |
| 1. krok | 94 °C | 4 min. | 94 °C | 4 min. |
| 2. krok | 94 °C * | 30 s | 94 °C | 30 s |
| 3. krok | 55 °C * | 45 s | 65 °C | 30 s |
| 4. krok | 72 °C * | 30 s | 72 °C | 20 s |
| 5. krok | 72 °C | 7 min. | 72 °C | 7 min. |
| opakování 2., 3. a 4. kroku | 40 x | | 40 x | |

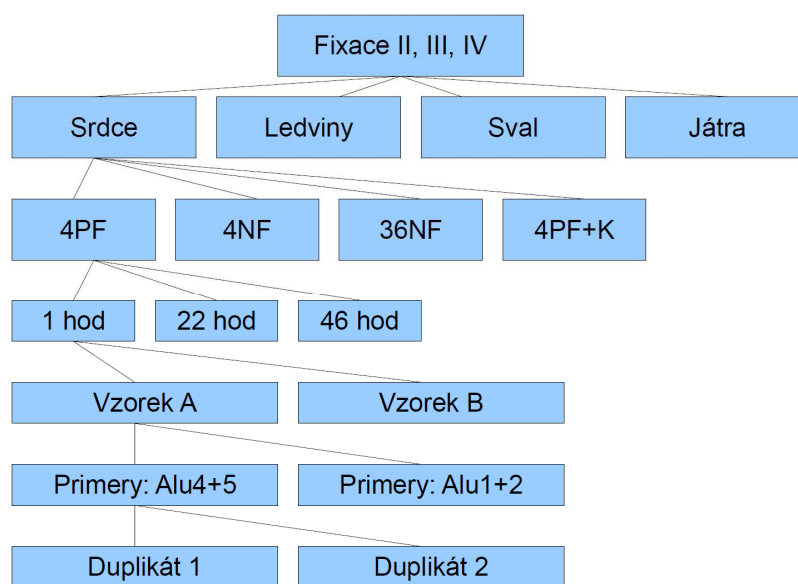
* U qPCR programu pro primery Alu1 + Alu2 byla mezi 2. a 3. krokem rychlost změny teploty (ramp speed) 13 % a mezi 3. a 4. krokem rychlost změny teploty (ramp speed) 21 %.

Tabulka 3: Program použitý pro měření efektivity qPCR reakce (melting curve analysis).

| Nastavení měření | | |
|------------------|---------|----------|
| krok | teplota | Čas |
| 1. krok | 95 °C | 15 s |
| 2. krok | 60 °C * | 15 s |
| 3. krok | 95 °C * | 15 s |
| 4. krok | 4 °C | neomezen |

* Doba změny teploty (ramp time) mezi 2. a 3. krokem byla 20 min.

Reakce probíhala v celkovém objemu 15 μ l. Přesné složení qPCR směsi je uvedeno v kapitole 3.1.4. Jako standard byla použita DNA (SRM 2372 Human DNA Quantitation Standard) od instituce NIST (USA) v koncentracích 1,850 ng/ μ l; 0,210 ng/ μ l a 0,023 ng/ μ l. Jako negativní kontrola byla připravena reakční směs, která neobsahovala templátovou DNA ze vzorku. Koncentrace vyizolované DNA byla určena na základě srovnání amplifikační dynamiky stanovované DNA s amplifikační dynamikou DNA standardů o známé koncentraci. Fragmentace vyizolované DNA byla stanovena pomocí tzv. degradačního indexu (DI) (Vernarecci, 2015), tedy poměrem koncentrací rozdílně dlouhých produktů qPCR reakce získaných použitím uvedených párů primerů. Každý ze vzorků A a B byl pro qPCR analýzu změřen v duplikátu. Měření bylo provedeno na přístroji Real Time PCR Mastercycler system ep realplex (Eppendorf, Německo). Schéma experimentu je znázorněno na Obrázku 3.



Obrázek 3: Schéma qPCR experimentů. Vzorky z tkáně srdce, ledviny, svalu a jater od tří dárců z Fixace II, III a IV byly fixovány v roztocích: 4% (v/v) pufrovaný formaldehyd (4PF), 4% (v/v) nepufrovaný formaldehyd (4NF), 36% (v/v) nepufrovaný formaldehyd (36NF) a 4% (v/v) pufrovaný formaldehyd s 4% (v/v) kyselinou mravenčí (4PF+K) po dobu 1 hod, 22 hod. a 46 hod. Poté byly z každé tkáně odebrány 2 vzorky (vzorek A a B), ze kterých byla vyizolována DNA. Koncentrace DNA byla stanovena metodou qPCR pomocí dvou párů primerů pro lidské Alu sekvence (Alu4+5 a Alu1+2). qPCR měření bylo provedeno vždy v duplikátu pro každý ze vzorků A a B.

3.2.6 Stanovení koncentrace DNA fluorometrickým měřením

Koncentrace DNA stanovená na základě měření fluorescence byla provedena pomocí kitu Qubit dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen, USA), který obsahoval: Qubit dsDNA HS reagent a Qubit dsDNA HS buffer. Nejprve byl připraven roztok Qubit working solution, a to smícháním 1 dílu roztoku Qubit dsDNA HS reagent a 199 dílů roztoku Qubit dsDNA HS buffer. K 1–20 μ l analyzovaného vzorku o neznámé koncentraci byl přidán roztok Qubit working solution do objemu 200 μ l. Výsledný roztok byl krátce zvortexován a inkubován po 2 min. při RT. Měření probíhalo na spektrometru BioSpectrometer (Eppendorf, Německo) v jednorázové plastové kyvetě při RT. Vlnová délka excitačního světla byla 470 nm. Vlnová délka emisního světla byla 520 nm. Standardy o koncentraci 0; 1,96; 3,91; 15,63; 62,5; 125; 250 a 500 pg/ μ l byly připraveny a změřeny stejným způsobem z roztoků DNA standard Qubit dsDNA HS Standard No. 1 a DNA standard Qubit dsDNA HS Standard No. 2.

3.2.7 Stanovení koncentrace a míry fragmentace pomocí čipové elektroforézy na bioanalyzáru Agilent 2100

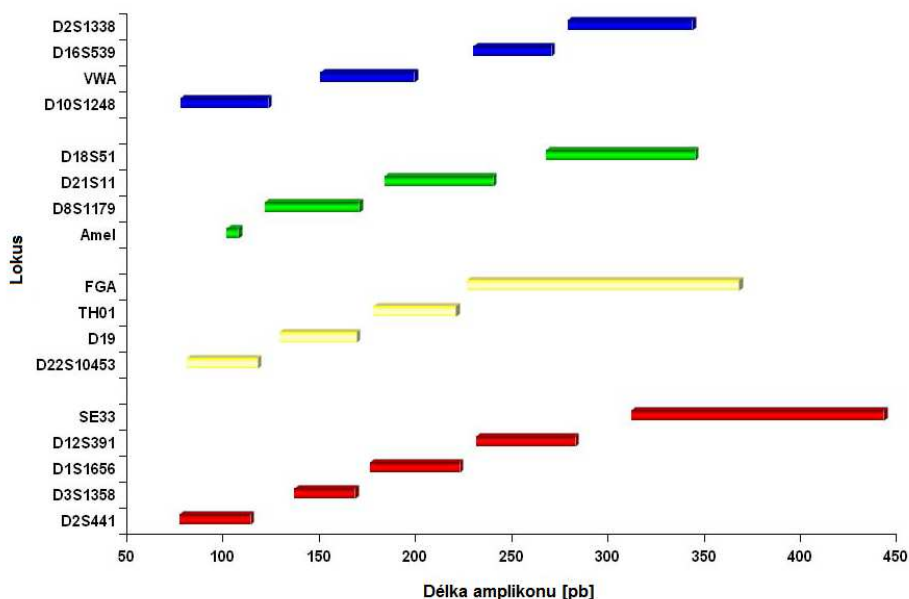
Stanovení koncentrace a míry fragmentace DNA na přístroji bioanalyzáru Agilent 2100 (Agilent Technologies, USA) bylo provedeno pomocí kitu Agilent High Sensitivity DNA (Agilent Technologies, USA) (kit obsahoval: High Sensitivity DNA chip, High Sensitivity DNA dye concentrate, High Sensitivity DNA gel matrix, High Sensitivity DNA marker a High Sensitivity DNA ladder). Prvním krokem byla příprava čipu High Sensitivity DNA chip. Roztoky High Sensitivity DNA dye concentrate a High Sensitivity DNA gel matrix byly 30 min. bez přístupu světla temperovány na RT, roztok High Sensitivity DNA dye byl následně zvortexován, stočen a v objemu 15 μ l přidán do zkumavky s alikvotem roztoku High Sensitivity DNA gel matrix. Výsledný roztok byl zvortexován, nanesen na kolonku a centrifugován (2240 x g, 10 min.). Následně bylo 9 μ l tohoto roztoku napipetováno do příslušné jamky na čip umístěný v přípravné stanici, tato přípravná stanice byla uzavřena a pomocí tlakovacího zařízení (nastaveného na objem 1 ml) byl 1 min. vyvíjen na gel tlak, který způsobil jeho rovnoměrné rozptýlení v čipu. Po otevření přípravné stanice bylo do dalších tří příslušných jamek napipetováno 9 μ l roztoku High Sensitivity DNA dye + High Sensitivity DNA gel matrix. Následně bylo do zbývajících 12 jamek napipetováno po 5 μ l roztoku High Sensitivity DNA marker (vnitřní standard). Do jedné z těchto jamek byl napipetován 1 μ l roztoku High Sensitivity DNA ladder a do zbylých 11 jamek bylo

napipetováno po 1 µl měřených vzorků. Na základě optimalizačních měření byly vybrány vzorky před nanesením na čip zakoncentrovány na přístroji Concentrator 5301 (Eppendorf, Německo). Čip se vzorky byl vortexován (2400 rpm, 1 min.). Měření bylo provedeno na přístroji bioanalyzátor Agilent 2100 (Agilent Technologies, USA) a následná analýza proběhla v programu Expert 2100 (Agilent Technologies, USA).

3.2.8 Genetická identifikace analýzou krátkých tandemově se opakujících repetit (STR)

Procesy izolace DNA a její kvantifikace, které jsou součástí genetické identifikace analýzou STR, jsou popsány v kapitolách 3.2.4 a 3.2.5. Následujícím krokem analýzy STR je amplifikace a značení nascentních sekvencí DNA (ke značení se používají 4 fluorescenční barvy, které jsou vyhodnocovány ve 4 detekčních kanálech) metodou multiplexové PCR. Poté následuje denaturace dvouřetězcových ampliconů na jednořetězcovou DNA, jejíž velikost je analyzována na kapilární elektroforéze. Získaná data jsou pomocí vnitřního standardu porovnávána s alelickým žebříkem, výsledkem je elektroforetogram, kde pozice píku na ose x určuje délku ampliconu (a tím počet repetit v příslušné STR alele) a výška píku, daná intenzitou fluorescenčního signálu, odráží relativní množství amplifikované DNA ve vzorku.

Na PCR amplifikaci byl použit kit STR AmpFLSTR NGM SElect (Applied Biosystems, USA) (obsahující NGM SElect Master Mix, NGM SElect Primer Set, AmpFLSTR NGM SElect Allelic Ladder), který je založen na použití 17 párů primerů, které amplifikují 17 lokusů lidské DNA (16 autozomálních STR: D10S1248, D3S1358, vWA, D16S539, D2S1338, D8S1179, D21S11, D18S51, D19S433, TH01, FGA, D22S1045, D2S441, D1S1656, D12S391 a SE33 + 1 gonozomální marker: Amelogenin) (Green *et al.*, 2013). Porovnání velikostí lokusů je znázorněno na Obrázku 4.



Obrázek 4: Porovnání délek lokusů STR detekovaných kitem AmpFLSTR NGM Select (Applied Biosystems, USA). Na obrázku je znázorněno uspořádání lokusů do 4 fluorescenčních kanálů a rozmezí možných délek jednotlivých ampliconů v závislosti na přítomných alelách.

Reakční směs pro multiplexovou PCR a její složení bylo následující:

| | |
|--|---------------------------|
| NGM Select Master Mix | 2,5 µl |
| NGM Select Primer Set | 1,25 µl |
| cílová DNA | 0,25 ng |
| H ₂ O (o čistotě pro PCR, tzv. PCR-grade) | doplnit do objemu 6,25 µl |

V případě vybraných vzorků fixovaných roztoky 36NF a 4PF+K po 22 hod. a 46 hod. byla reakční směs pro PCR a její složení následující:

| | |
|--|---------------------------|
| NGM Select Master Mix | 5 µl |
| NGM Select Primer Set | 2,5 µl |
| cílová DNA | 0,5 ng |
| H ₂ O (o čistotě pro PCR, tzv. PCR-grade) | doplnit do objemu 12,5 µl |

V případě potřeby byly vzorky DNA zakoncentrovány na přístroji Concentrator 5301 (Eppendorf, Německo). Multiplexová PCR proběhla na přístroji Mastercycler nexus gradient (Eppendorf, Německo), nastavení PCR programu je uvedeno v Tabulce 4.

Tabulka 4: PCR program použitý pro STR analýzu.

| Nastavení měření | | |
|-------------------------|---------|----------|
| krok | teplota | Čas |
| 1. krok | 95 °C | 11 min. |
| 2. krok | 94 °C | 20 s |
| 3. krok | 59 °C | 3 min. |
| 4. krok | 60 °C | 10 min. |
| 5. krok | 4 °C | neomezen |
| opakování 2. a 3. kroku | 30 x | |

Následně proběhla příprava amplifikované DNA na elektroforézu. K PCR produktu o objemu 1 µl (nebo 3 µl v případě vybraných vzorků fixovaných roztoky 36NF a 4PF+K po 22 hod. a 46 hod.) bylo přidáno 0,6 µl vnitřního standardu GeneScan 600 LIZ Size Standard v 2.0 (Life Technologies, USA) a 12 µl Hi-Di Formamidu (Life Technologies, USA). Výsledný roztok byl zahříván 3 min. na 95 °C a následně byl ihned přenesen do namraženého bločku, kde byl ponechán 3 min. Stejně byl připraven i roztok alelického žebříčku AmpFLSTR NGM Select Allelic Ladder. Elektroforetická analýza probíhala na přístroji ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA), všechny vzorky byly do DNA analyzátoru injikovány 5 s s výjimkou vybraných vzorků fixovaných 22 hod. a 46 hod. roztoky 36NF a 4PF+K, tyto byly injikovány 10 s. Vyhodnocení bylo provedeno v programu Gene Mapper ID (Applied Biosystems, USA).

4 Výsledky

Celkem byly provedeny 4 fixační experimenty: Fixace I (3.2.1), Fixace II, Fixace III a Fixace IV (3.2.2). Pro Fixaci I–IV byly použity následující roztoky: 4% (v/v) pufrovaný formaldehyd (4PF), 4% (v/v) nepufrovaný formaldehyd (4NF), 36% (v/v) nepufrovaný formaldehyd (36NF) a 4% (v/v) pufrovaný formaldehyd s 4% (v/v) kyselinou mravenčí (4PF+K) (3.1.4).

Fixace I sloužila jako pilotní experiment. Abychom se vyhnuli případné chybě zanesené nesprávným výběrem fixované tkáně, bylo testováno více typů lidských tkání (3.1.3). Zvoleny byly tyto tkáně: plíce, srdce, slezina, ledvina a sval. Bylo zjištěno, že plíce a slezina nejsou dobrými experimentálními modely kvůli jejich náročnosti na korektní zpracování. Plicní tkáň ve fixačním roztoku plove, a tudíž nemusí docházet k homogenní fixaci. Slezinná tkáň je velmi křehká, a proto se s ní velmi špatně manipuluje.

Pro následné Fixace II, III a IV byly tedy zvoleny tyto tkáně: srdce, ledvina, sval a játra. Zároveň byl proces optimalizován přidáním kroku zavodnění a odvodnění fixované tkáně (3.2.3). V případě Fixace II byla část srdeční tkáně ještě před fixací naložena na 24 hodin do konzervačního přípravku DNAGard Tissue (Biomatrix, USA) (3.1.3). Použití jednotlivých tkání, fixačních roztoků a fixačních časů v jednotlivých experimentech je shrnuto v Tabulce 5.

Tabulka 5: Přehled fixačních experimentů. V tabulce jsou shrnuty použité tkáně, roztoky a fixační časy.

| Fixace Tkáň | Fixace I (1 hod., 46 hod.) | Fixace II, III, IV (1 hod., 22 hod., 46 hod.) |
|-----------------|-------------------------------|--|
| Plíce | 4PF, 4NF, 36NF, 4PF+K | - |
| Slezina | 4PF, 4NF, 36NF, 4PF+K | - |
| Srdce | 4PF, 4NF, 36NF, 4PF+K | 4PF, 4NF, 36NF, 4PF+K |
| Ledvina | 4PF, 4NF, 36NF, 4PF+K | 4PF, 4NF, 36NF, 4PF+K |
| Sval | 4PF, 4NF, 36NF, 4PF+K | 4PF, 4NF, 36NF, 4PF+K |
| Játra | - | 4PF, 4NF, 36NF, 4PF+K |
| Srdce + DNAGard | - | 4PF, 4NF, 36NF, 4PF+K |

4PF = 4% (v/v) pufrovaný formaldehyd, 4NF = 4% (v/v) nepufrovaný formaldehyd, 36NF = 36% (v/v) nepufrovaný formaldehyd, 4PF+K = 4% (v/v) pufrovaný formaldehyd s 4% (v/v) kyselinou mravenčí.

Po fixaci a následném zavodnění a odvodnění tkáně (3.2.3) byla tkáň štěpena proteinázou K (Zymo Research, USA) a následně byla ze vzorků vyizolována DNA (3.2.4) a její koncentrace a kvalita byly ohodnoceny různými metodickými přístupy.

Vzhledem k tomu, že délka a teplotní průběh PMI před samotnou izolací DNA velmi výrazně ovlivňují následné výtěžky (Hansen *et al.*, 2014) a protože námi provedené experimenty (Fixace II–IV) se ve zmíněných parametrech PMI neshodovaly, jsou výsledky z jednotlivých experimentů prezentovány jednotlivě a nikoli souhrnně.

4.1 Délka fixace a chemické složení fixačního roztoku formaldehydu má vliv na množství a stupeň fragmentace vyizolované DNA

Z naší laboratorní praxe a publikované odborné literatury (Hewitt *et al.*, 2008) bylo zjištěno, že DNA izolovaná pro molekulárně biologické účely z FFPE bločků nemusí být vždy v dostatečně vysoké kvalitě a kvantitě, což komplikuje následnou aplikaci molekulárně biologických metod. Rozhodli jsme se tedy ověřit, jak různé chemické složení roztoku formaldehydu, který se používá jako fixační roztok v přípravě FFPE bločků, ovlivňuje množství a stupeň fragmentace DNA izolované z FFPE bločků.

Pro fixační experimenty proto bylo připraveno několik variant roztoku formaldehydu (3.1.4). Prvním roztokem byl 4% pufrovaný formaldehyd (4PF), který je hojně používaným fixačním činidlem, a vzhledem k stabilnímu pH byl očekáván relativně nízký negativní vliv na DNA. Druhým roztokem byl 4% nepufrovaný formaldehyd (4NF), také používaný jako fixační činidlo, u kterého lze vzhledem k nepřítomnosti pufru očekávat výraznější vliv na DNA oproti pufrovanému formaldehydu. Třetím roztokem byl 36% nepufrovaný formaldehyd (36NF), který byl použit vzhledem k tomu, že si některé laboratoře formaldehyd ředí samy, a mohlo by tedy docházet k jeho nedostatečnému naředění. Dalším roztokem byl 4% pufrovaný formaldehyd s přidavkem kyseliny mravenčí (4PF+K) v konečné koncentraci 4 % (v/v). Tento roztok byl zvolen jako simulace výrazně znehodnoceného formaldehydu, v takovém totiž dochází k tvorbě a akumulaci kyseliny mravenčí, která je známá svým negativním působením na DNA (Fox *et al.*, 1985; Koshiba *et al.*, 1993).

Dalším důležitým faktorem, který má vliv na množství a kvalitu vyizolované DNA, je doba, po kterou fixace probíhá (Ferrer *et al.*, 2007; Khoja *et al.*, 2012). Na pracovištích

patologie či soudního lékařství je běžně používaná doba fixace vzorku formaldehydem před jeho zalitím do parafínu a následným histologickým zhodnocením 12–24 hod. (viz Tabulka P1, Příloha). Nicméně fixační procedura může dosahovat časových hodnot od 1 hod. až k 48 hod. Na základě těchto skutečností byly zvoleny tři časové úseky, po které probíhala fixace tkání: 1 hod., 22 hod. a 46 hod.

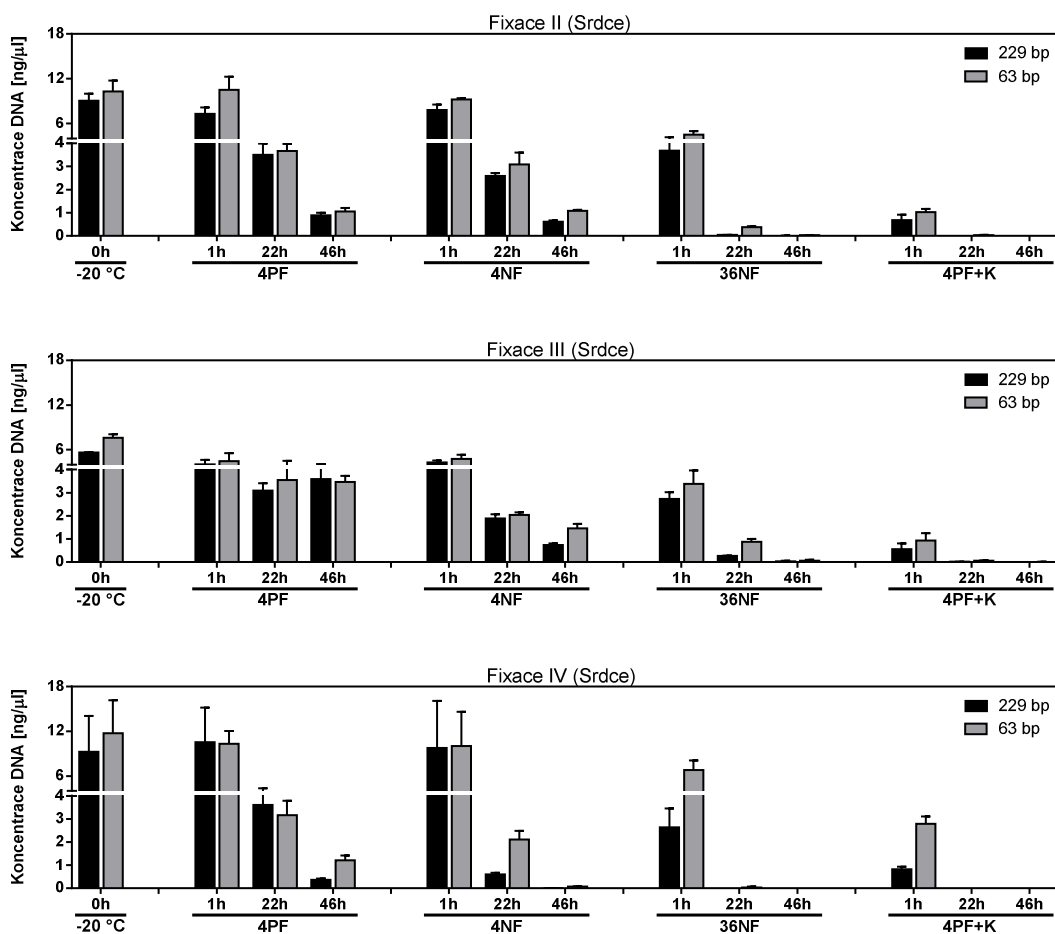
4.1.1 Stanovení koncentrace a míry fragmentace DNA metodou qPCR

Při měření stupně degradace a koncentrace DNA pomocí metody qPCR (3.2.5) byly použity dva páry primerů pro lidské Alu sekvence (3.1.5). Ty tvořily produkty o délce 229 bp a 63 bp. Dvojice primerů poskytující různě dlouhé produkty byla zvolena záměrně, aby bylo možné pomocí metody qPCR stanovit nejen celkovou koncentraci DNA, ale také stupeň její fragmentace. Jako kontrolní vzorek sloužila tkáň nefixovaná a zmražená na -20 °C, jedná se tedy o čas 0 hod. Hodnoty koncentrace DNA v grafech (Obrázky 5, 6, 7, 8) jsou znázorněny jako průměry čtyř hodnot ze vzorků A a B měřených v duplikátech a jejich směrodatné odchylky. Hodnoty koncentrací v Tabulce 6 byly spočítány jako průměry čtyř hodnot (qPCR produktů o délce 229 bp) z duplikátů vzorků A a B. Zobrazeny jsou jako procento hodnoty kontrolního vzorku, který byl stanoven jako 100 %.

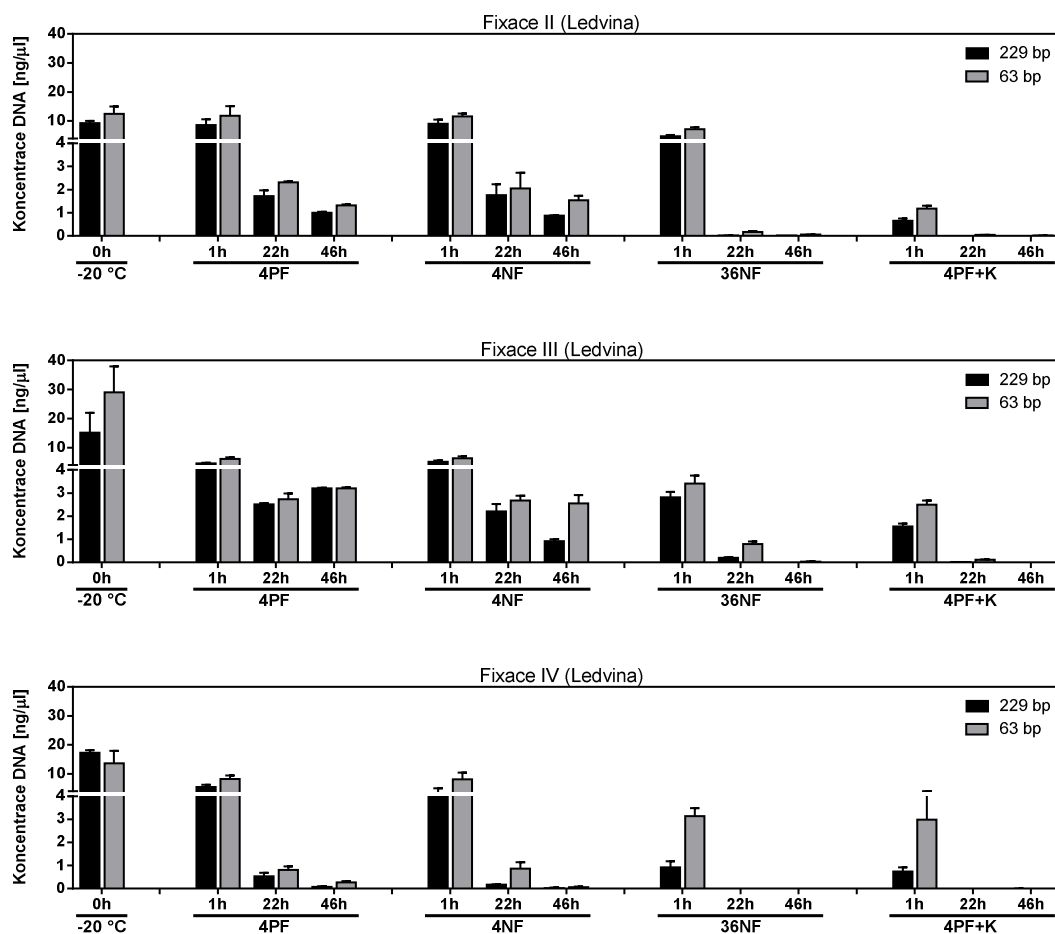
V případě všech fixací (Fixace II, III, IV) je u všech tkání (srdce, ledvina, sval, játra: Obrázky 5, 6, 7, 8 a Tabulka 6) patrný trend, kdy vzorky fixované po dobu 1 hod. roztoky 4PF a 4NF mají výtěžky DNA oproti kontrole snížené relativně nejméně či vůbec. Výraznější snížení výtěžků bylo pozorováno v případě použití roztoku 36NF a nejvýraznější snížení pak u roztoku 4PF+K. V případě prodloužení fixace na 22 hod. až 46 hod. dochází u roztoků 4PF a 4NF k postupnému snižování výtěžků DNA, které je vyšší u roztoku 4NF. U roztoků 36NF a 4PF+K již při 22 hod. nejsou pozorovatelné téměř žádné výtěžky DNA.

Při porovnání Fixace IV s Fixací II a III je patrné, že absolutní výtěžky DNA u jater z Fixace IV jsou celkově malé. Nižší výtěžky byly naměřeny u kontroly a vzorků fixovaných 1 hod., a to v případě všech fixačních roztoků; u fixace 22 hod. a 46 hod. již DNA není detekovatelná téměř vůbec, a to opět v případě všech fixačních roztoků (dokonce i u roztoků 4PF a 4NF) (Obrázek 8). Dále je u jaterní tkáně vidět, že relativní snížení výtěžků DNA mezi kontrolou a vzorky fixovanými roztoky 4PF a 4NF po 22 hod. a 46 hod. bylo mnohem výraznější u Fixace IV oproti Fixacím II a III (Tabulka 6).

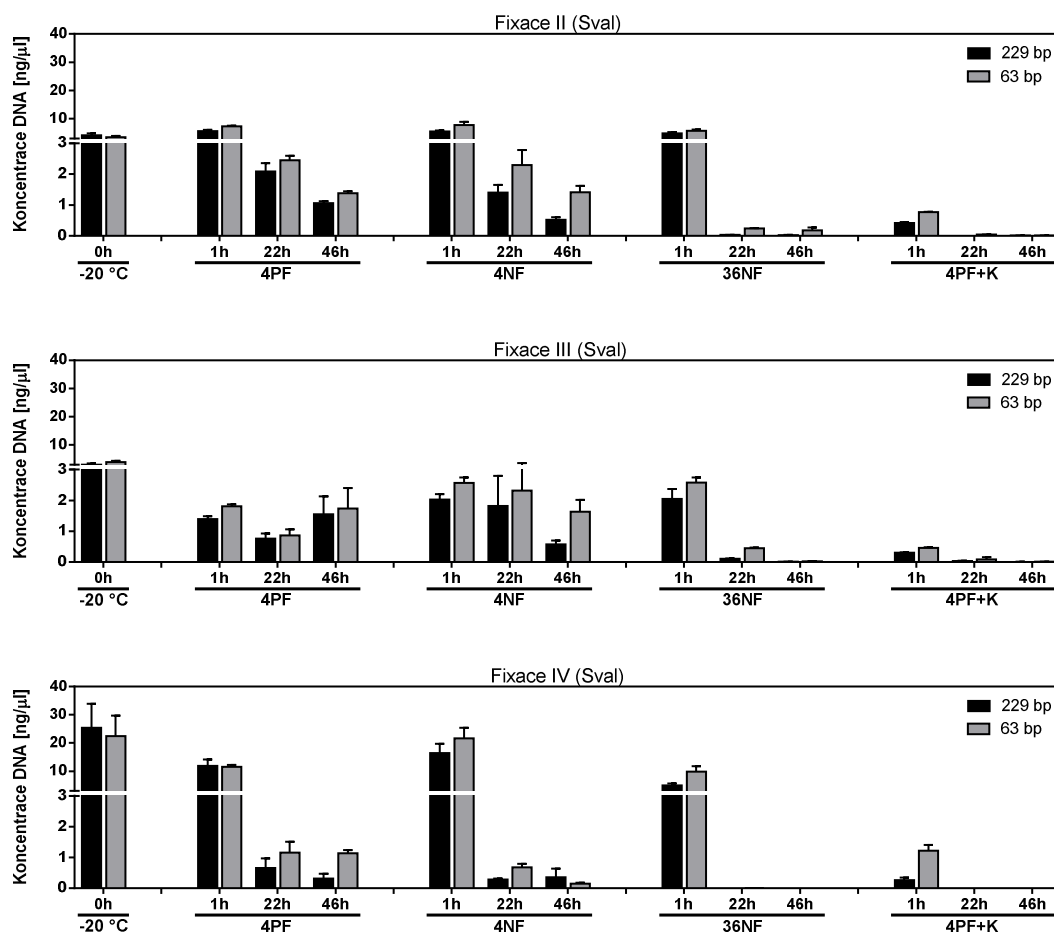
U ostatních tkání Fixace IV byly výtěžky u kontrol a tkání fixovaných po čas 1 hod. všemi roztoky srovnatelné s Fixací II a III. Rozdíl Fixace IV oproti Fixacím II a III byl však v relativním snížení výtěžků DNA mezi kontrolou a roztoky 4PF (tkáň ledvinná a svalová) a 4NF (tkáň srdeční, ledvinná a svalová) v časech 22 hod. a 46 hod., které se u Fixace IV projevilo výrazněji než u Fixací II a III (Tabulka 6). U roztoků 36NF a 4PF+K v časech 22 hod. a 46 hod. jsou výtěžky DNA obecně ve všech experimentech velmi nízké, tudíž toto rozdílné relativní snížení výtěžků oproti kontrole není tak výrazné.



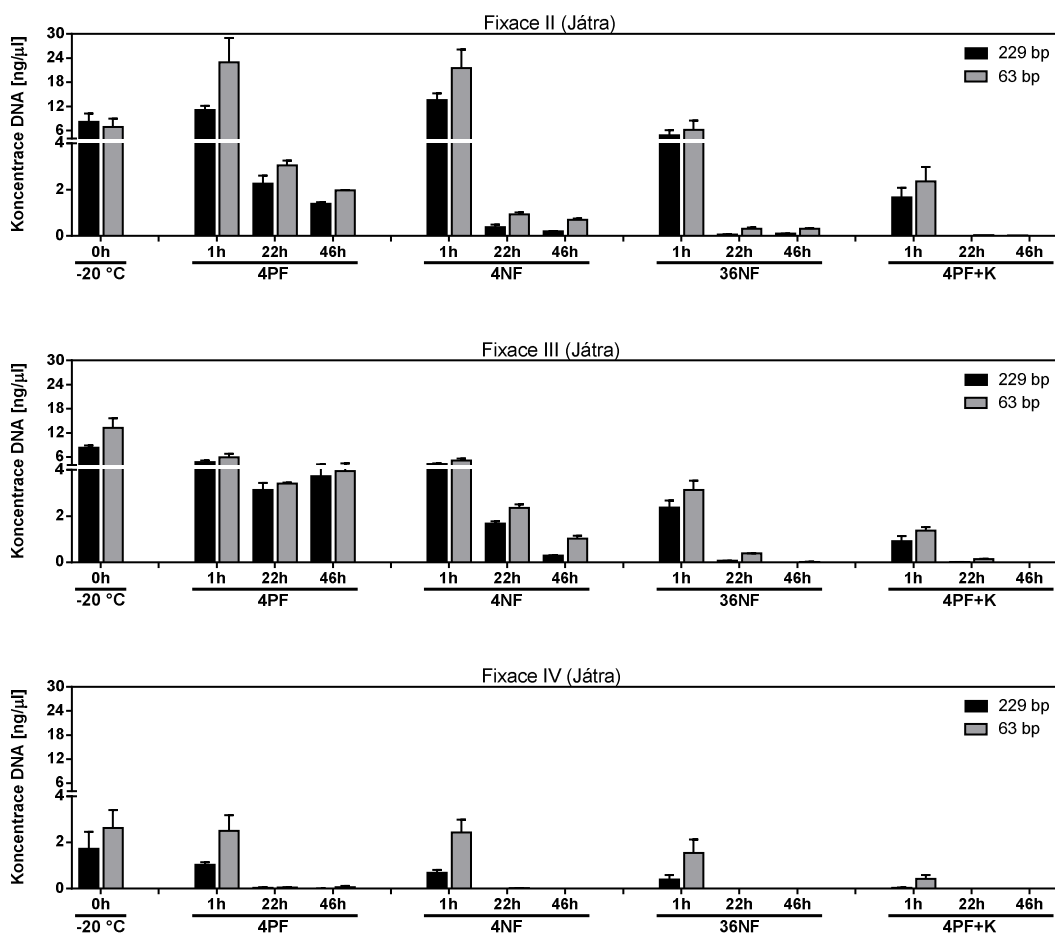
Obrázek 5: Koncentrace a míra degradace DNA vyizolované ze srdeční tkáně stanovená metodou qPCR v závislosti na použitém roztoku a délce fixace. Vzorky ze srdeční tkáně od tří dárců z Fixace II, III a IV (Fixace II: muž, 50–60 let, PMI 7 dní; teplotní profil: 5 dní 6–10 °C; 2 hod. RT; 48 hod. 4 °C; Fixace III: muž, 82 let, PMI 4 dny; teplotní profil: 3 dny 6–10 °C; 2 hod. RT; 24 hod. 4 °C; Fixace IV: žena, 60 let, PMI 5–6 dní; teplotní profil: 3–4 dny RT, 1 den 6–10 °C; 2 hod. RT; 24 hod. 4 °C) byly fixovány po dobu 1 hod, 22 hod. a 46 hod. v roztocích: 4% (v/v) pufovaný formaldehyd (4PF), 4% (v/v) nepufovaný formaldehyd (4NF), 36% (v/v) nepufovaný formaldehyd (36NF) a 4% (v/v) pufovaný formaldehyd s 4% (v/v) kyselinou mravenčí (4PF+K). Jako kontrola sloužila tkáň nefixovaná a zmražená na -20 °C, jedná se tedy o čas 0 hod. Poté byla ze vzorků vyizolována DNA a její koncentrace byla stanovena qPCR pomocí dvou párů primerů pro lidské Alu sekveny, které tvořily produkty o délkách 229 bp a 63 bp. Hodnoty koncentrace DNA v grafech jsou znázorněny jako průměry čtyř hodnot ze vzorků A a B měřených v duplikátech a jejich směrodatné odchylky.



Obrázek 6: Koncentrace a míra degradace DNA vyizolované z ledvinné tkáně stanovená metodou qPCR v závislosti na použitém roztoku a délce fixace. Vzorky z ledvinné tkáně od tří dárců z Fixace II, III a IV (Fixace II: muž, 50–60 let, PMI 7 dní; teplotní profil: 5 dní 6–10 °C; 2 hod. RT; 48 hod. 4 °C; Fixace III: muž, 82 let, PMI 4 dny; teplotní profil: 3 dny 6–10 °C; 2 hod. RT; 24 hod. 4 °C; Fixace IV: žena, 60 let, PMI 5–6 dní; teplotní profil: 3–4 dny RT, 1 den 6–10 °C; 2 hod. RT; 24 hod. 4 °C) byly fixovány po dobu 1 hod, 22 hod. a 46 hod. v roztocích: 4% (v/v) pufovaný formaldehyd (4PF), 4% (v/v) nepufovaný formaldehyd (4NF), 36% (v/v) nepufovaný formaldehyd (36NF) a 4% (v/v) pufovaný formaldehyd s 4% (v/v) kyselinou mravenčí (4PF+K). Jako kontrola sloužila tkáň nefixovaná a zmražená na -20 °C, jedná se tedy o čas 0 hod. Poté byla ze vzorků vyizolována DNA a její koncentrace byla stanovena qPCR pomocí dvou párů primerů pro lidské Alu sekvence, které tvořily produkty o délkách 229 bp a 63 bp. Hodnoty koncentrace DNA v grafech jsou znázorněny jako průměry čtyř hodnot ze vzorků A a B měřených v duplikátech a jejich směrodatné odchylky.



Obrázek 7: Koncentrace a míra degradace DNA vyizolované ze svalové tkáně stanovená metodou qPCR v závislosti na použitém roztoku a délce fixace. Vzorky ze svalové tkáně od tří dárců z Fixace II, III a IV (Fixace II: muž, 50–60 let, PMI 7 dní; teplotní profil: 5 dní 6–10 °C; 2 hod. RT; 48 hod. 4 °C; Fixace III: muž, 82 let, PMI 4 dny; teplotní profil: 3 dny 6–10 °C; 2 hod. RT; 24 hod. 4 °C; Fixace IV: žena, 60 let, PMI 5–6 dní; teplotní profil: 3–4 dny RT, 1 den 6–10 °C; 2 hod. RT; 24 hod. 4 °C) byly fixovány po dobu 1 hod, 22 hod. a 46 hod. v roztocích: 4% (v/v) pufovaný formaldehyd (4PF), 4% (v/v) nepufovaný formaldehyd (4NF), 36% (v/v) nepufovaný formaldehyd (36NF) a 4% (v/v) pufovaný formaldehyd s 4% (v/v) kyselinou mravenčí (4PF+K). Jako kontrola sloužila tkáň nefixovaná a zmražená na -20 °C, jedná se tedy o čas 0 hod. Poté byla ze vzorků vyizolována DNA a její koncentrace byla stanovena qPCR pomocí dvou párů primerů pro lidské Alu sekvence, které tvořily produkty o délkách 229 bp a 63 bp. Hodnoty koncentrace DNA v grafech jsou znázorněny jako průměry čtyř hodnot ze vzorků A a B měřených v duplikátech a jejich směrodatné odchylky.



Obrázek 8: Koncentrace a míra degradace DNA vyizolované z jaterní tkáně stanovená metodou qPCR v závislosti na použitém roztoku a délce fixace. Vzorky z jaterní tkáně od tří dárců z Fixace II, III a IV (Fixace II: muž, 50–60 let, PMI 7 dní; teplotní profil: 5 dní 6–10 °C; 2 hod. RT; 48 hod. 4 °C; Fixace III: muž, 82 let, PMI 4 dny; teplotní profil: 3 dny 6–10 °C; 2 hod. RT; 24 hod. 4 °C; Fixace IV: žena, 60 let, PMI 5–6 dní; teplotní profil: 3–4 dny RT, 1 den 6–10 °C; 2 hod. RT; 24 hod. 4 °C) byly fixovány po dobu 1 hod, 22 hod. a 46 hod. v roztocích: 4% (v/v) pufrovaný formaldehyd (4PF), 4% (v/v) nepufrovaný formaldehyd (4NF), 36% (v/v) nepufrovaný formaldehyd (36NF) a 4% (v/v) pufrovaný formaldehyd s 4% (v/v) kyselinou mravenčí (4PF+K). Jako kontrola sloužila tkáň nefixovaná a zmražená na -20 °C, jedná se tedy o čas 0 hod. Poté byla ze vzorků vyizolována DNA a její koncentrace byla stanovena qPCR pomocí dvou párů primerů pro lidské Alu sekvence, které tvořily produkty o délkách 229 bp a 63 bp. Hodnoty koncentrace DNA v grafech jsou znázorněny jako průměry čtyř hodnot ze vzorků A a B měřených v duplikátech a jejich směrodatné odchylky.

Tabulka 6: Vliv fixačního roztoku a délky fixace na výtěžky DNA vyjádřené jako procentuální změny ve výtěžcích DNA vzhledem ke kontrolním vzorkům. Vzorky z tkáně srdce, ledviny, svalu a jater od tří dárců z Fixace II, III a IV (Fixace II: muž, 50–60 let, PMI 7 dní; teplotní profil: 5 dní 6–10 °C; 2 hod. RT; 48 hod. 4 °C; Fixace III: muž, 82 let, PMI 4 dny; teplotní profil: 3 dny 6–10 °C; 2 hod. RT; 24 hod. 4 °C; Fixace IV: žena, 60 let, PMI 5–6 dní; teplotní profil: 3–4 dny RT, 1 den 6–10 °C; 2 hod. RT; 24 hod. 4 °C) byly fixovány po dobu 1 hod, 22 hod. a 46 hod. v roztocích: 4% (v/v) pufrovaný formaldehyd (4PF), 4% (v/v) nepufrovaný formaldehyd (4NF), 36% (v/v) nepufrovaný formaldehyd (36NF) a 4% (v/v) pufrovaný formaldehyd s 4% (v/v) kyselinou mravenčí (4PF+K). Jako kontrola sloužila tkáň nefixovaná a zmražená na -20 °C, jedná se tedy o čas 0 hod. Poté byla ze vzorků vyizolována DNA a její koncentrace byla stanovena qPCR. Hodnoty koncentrací jsou průměry čtyř hodnot (qPCR produktů o délce 229 bp) z duplikátů vzorků A a B a zobrazeny jsou jako procento hodnoty kontrolního vzorku, který byl stanoven jako 100 %. Barevná škála: 0% výtěžky (červená) – 166% výtěžky (zelená).

| | | Fixace II | | | Fixace III | | | Fixace IV | | |
|---------|--------|-----------|--------|--------|------------|--------|--------|-----------|--------|-------|
| | | 1 h | 22 h | 46 h | 1 h | 22 h | 46 h | 1 h | 22 h | 46 h |
| srdce | -20 °C | 100% | | | 100% | | | 100% | | |
| | 4PF | 80,58% | 38,81% | 9,80% | 71,66% | 54,82% | 63,84% | 114,07% | 39,07% | 3,97% |
| | 4NF | 86,61% | 28,69% | 6,85% | 76,06% | 33,67% | 12,97% | 105,71% | 6,50% | 0,09% |
| | 36NF | 40,80% | 0,44% | 0,07% | 48,47% | 4,76% | 0,58% | 28,52% | 0,02% | 0,01% |
| | 4PF+K | 7,53% | 0,03% | 0,05% | 9,77% | 0,25% | 0,06% | 8,83% | 0,01% | 0,01% |
| ledvina | -20 °C | 100% | | | 100% | | | 100% | | |
| | 4PF | 93,10% | 18,59% | 10,85% | 30,02% | 16,56% | 21,07% | 31,52% | 3,08% | 0,44% |
| | 4NF | 97,66% | 19,02% | 9,37% | 33,23% | 14,53% | 6,02% | 23,03% | 0,97% | 0,11% |
| | 36NF | 50,81% | 0,15% | 0,13% | 18,52% | 1,27% | 0,02% | 5,31% | 0,00% | 0,01% |
| | 4PF+K | 7,07% | 0,02% | 0,04% | 10,24% | 0,08% | 0,02% | 4,30% | 0,00% | 0,03% |
| sval | -20 °C | 100% | | | 100% | | | 100% | | |
| | 4PF | 137,91% | 50,98% | 25,95% | 46,05% | 24,98% | 50,90% | 46,67% | 2,59% | 1,24% |
| | 4NF | 133,15% | 34,25% | 12,76% | 66,61% | 59,83% | 18,95% | 64,44% | 1,14% | 1,39% |
| | 36NF | 117,03% | 0,73% | 0,66% | 67,43% | 3,56% | 0,22% | 19,38% | 0,00% | 0,00% |
| | 4PF+K | 10,12% | 0,04% | 0,24% | 9,81% | 0,89% | 0,16% | 1,05% | 0,00% | 0,00% |
| játra | -20 °C | 100% | | | 100% | | | 100% | | |
| | 4PF | 136,15% | 27,79% | 17,09% | 57,00% | 37,79% | 45,02% | 59,77% | 1,89% | 0,41% |
| | 4NF | 166,00% | 4,68% | 2,43% | 50,87% | 20,27% | 3,54% | 39,46% | 0,18% | 0,03% |
| | 36NF | 58,84% | 0,78% | 1,22% | 28,59% | 0,84% | 0,03% | 22,75% | 0,04% | 0,02% |
| | 4PF+K | 20,47% | 0,03% | 0,10% | 11,03% | 0,18% | 0,03% | 2,11% | 0,14% | 0,02% |

Degradace DNA byla stanovena tzv. degradačním indexem (DI) (3.2.5). Ten lze určit z poměru zastoupení kratších produktů (v našem případě 63 bp) vůči delším produktům (v našem případě 229 bp) qPCR reakce. Je-li DNA více degradovaná na kratší fragmenty, a delší produkty se tak již nemohou tolik tvořit, dochází k zvyšování poměru mezi kratším a delším fragmentem (DI se zvyšuje). DI qPCR produktů jsou vyneseny v Tabulce 7. Míra fragmentace DNA byla rozdělena do čtyř kategorií v závislosti na DI. Nedegradovaná DNA ($DI < 1,5$); mírně degradovaná DNA ($DI = 1,5-4$); středně degradovaná DNA ($DI = 4-10$); značně degradovaná DNA ($DI > 10$) (Vernarecci, 2015).

V případě všech tkání z Fixací II a III je při použití roztoku 4PF patrné, že tento v podstatě nezpůsobuje degradaci DNA, což platí pro všechny fixační časy. Roztok 4NF při stejných podmínkách zpravidla způsobuje degradaci při fixaci 46 hod. Roztok 36NF při stejných podmínkách zpravidla způsobuje degradaci již při fixaci 22 hod. Roztok 4PF+K při stejných podmínkách zpravidla způsobuje degradaci dokonce již při fixaci 1 hod. (Tabulka 7).

V případě Fixace IV dochází celkově k vyšší degradaci DNA, zvláště v případě ledvinné a jaterní tkáně. Degradace DNA byla navíc pozorována již v případě použití roztoku 4PF (u tkáně srdce při fixaci 46 hod. a tkáně svalů při fixaci 22 hod., u jaterní a ledvinné tkáně dokonce již při fixaci po dobu 1 hod.). I u ostatních roztoků byla degradace DNA pozorovatelná již při kratších fixačních časech ve srovnání s Fixací II a III (Tabulka 7).

V případech, že je koncentrace DNA stanovená oběma páry primerů blízká nule, nabývá DI nízkých hodnot, ačkoliv DNA může být velmi degradována.

Tabulka 7: Míra degradace vyizolované DNA znázorněná pomocí degradační indexů (DI) v závislosti na použitém roztoku a délce fixace. Vzorky z tkáně srdce, ledvin, svalů a jater od tří dárců z Fixace II, III a IV (Fixace II: muž, 50–60 let, PMI 7 dní; teplotní profil: 5 dní 6–10 °C; 2 hod. RT; 48 hod. 4 °C; Fixace III: muž, 82 let, PMI 4 dny; teplotní profil: 3 dny 6–10 °C; 2 hod. RT; 24 hod. 4 °C; Fixace IV: žena, 60 let, PMI 5–6 dní; teplotní profil: 3–4 dny RT, 1 den 6–10 °C; 2 hod. RT; 24 hod. 4 °C) byly fixovány po dobu 1 hod, 22 hod. a 46 hod. v roztocích: 4% (v/v) pufrovaný formaldehyd (4PF), 4% (v/v) nepufrovaný formaldehyd (4NF), 36% (v/v) nepufrovaný formaldehyd (36NF) a 4% (v/v) pufrovaný formaldehyd s 4% (v/v) kyselinou mravenčí (4PF+K). Jako kontrola sloužila tkáň nefixovaná a zmražená na -20 °C, jedná se tedy o čas 0 hod. Poté byla ze vzorků vyizolována DNA a její koncentrace byla stanovena qPCR. Zobrazeny jsou degradační indexy vypočítané jako poměr dvou párů primerů pro lidské Alu sekvence, které tvořily produkty o délkách 229 bp a 63 bp. Barevné značení: zelená = nedegradovaná DNA (DI < 1,5); žlutá = mírně degradovaná DNA (DI = 1,5–4); oranžová = středně degradovaná DNA (DI = 4–10); červená = značně degradovaná DNA (DI > 10).

| | | Fixace II | | | Fixace III | | | Fixace IV | | |
|---------|--------|-----------|------|------|------------|------|------|-----------|------|------|
| | | 1 h | 22 h | 46 h | 1 h | 22 h | 46 h | 1 h | 22 h | 46 h |
| srdce | -20 °C | 1,1 | | | 1,3 | | | 1,3 | | |
| | 4PF | 1,4 | 1,0 | 1,2 | 1,1 | 1,2 | 1,0 | 1,0 | 0,9 | 3,3 |
| | 4NF | 1,2 | 1,2 | 1,7 | 1,1 | 1,1 | 2,0 | 1,0 | 3,5 | 9,7 |
| | 36NF | 1,2 | 9,3 | 3,6 | 1,2 | 3,3 | 1,9 | 2,6 | 27,6 | 5,6 |
| | 4PF+K | 1,5 | 10,7 | 1,0 | 1,7 | 4,0 | 2,0 | 3,4 | 6,6 | 2,3 |
| ledvina | -20 °C | 1,3 | | | 1,9 | | | 0,8 | | |
| | 4PF | 1,4 | 1,3 | 1,3 | 1,3 | 1,1 | 1,0 | 1,5 | 1,5 | 3,6 |
| | 4NF | 1,3 | 1,2 | 1,8 | 1,2 | 1,2 | 2,8 | 2,0 | 5,1 | 3,2 |
| | 36NF | 1,5 | 12,0 | 5,1 | 1,2 | 4,1 | 11,9 | 3,4 | 10,0 | 3,4 |
| | 4PF+K | 1,8 | 24,4 | 2,0 | 1,6 | 9,6 | 1,9 | 4,0 | 4,4 | 0,2 |
| sval | -20 °C | 0,8 | | | 1,3 | | | 0,9 | | |
| | 4PF | 1,3 | 1,2 | 1,3 | 1,3 | 1,1 | 1,1 | 1,0 | 1,7 | 3,6 |
| | 4NF | 1,4 | 1,6 | 2,7 | 1,3 | 1,3 | 2,8 | 1,3 | 2,4 | 0,4 |
| | 36NF | 1,2 | 7,9 | 6,6 | 1,3 | 4,2 | 3,9 | 2,0 | 8,6 | 5,4 |
| | 4PF+K | 1,8 | 25,6 | 0,6 | 1,5 | 3,4 | 1,7 | 4,6 | 3,0 | 5,2 |
| játra | -20 °C | 0,8 | | | 1,6 | | | 1,5 | | |
| | 4PF | 2,1 | 1,3 | 1,4 | 1,3 | 1,1 | 1,1 | 2,4 | 1,5 | 10,0 |
| | 4NF | 1,6 | 2,4 | 3,5 | 1,2 | 1,4 | 3,5 | 3,6 | 7,1 | 9,9 |
| | 36NF | 1,3 | 4,9 | 3,1 | 1,3 | 5,6 | 6,6 | 3,9 | 4,8 | 4,9 |
| | 4PF+K | 1,4 | 9,5 | 0,6 | 1,5 | 9,9 | 1,9 | 11,7 | 1,2 | 3,2 |

4.1.2 Stanovení koncentrace DNA fluorometrickým měřením

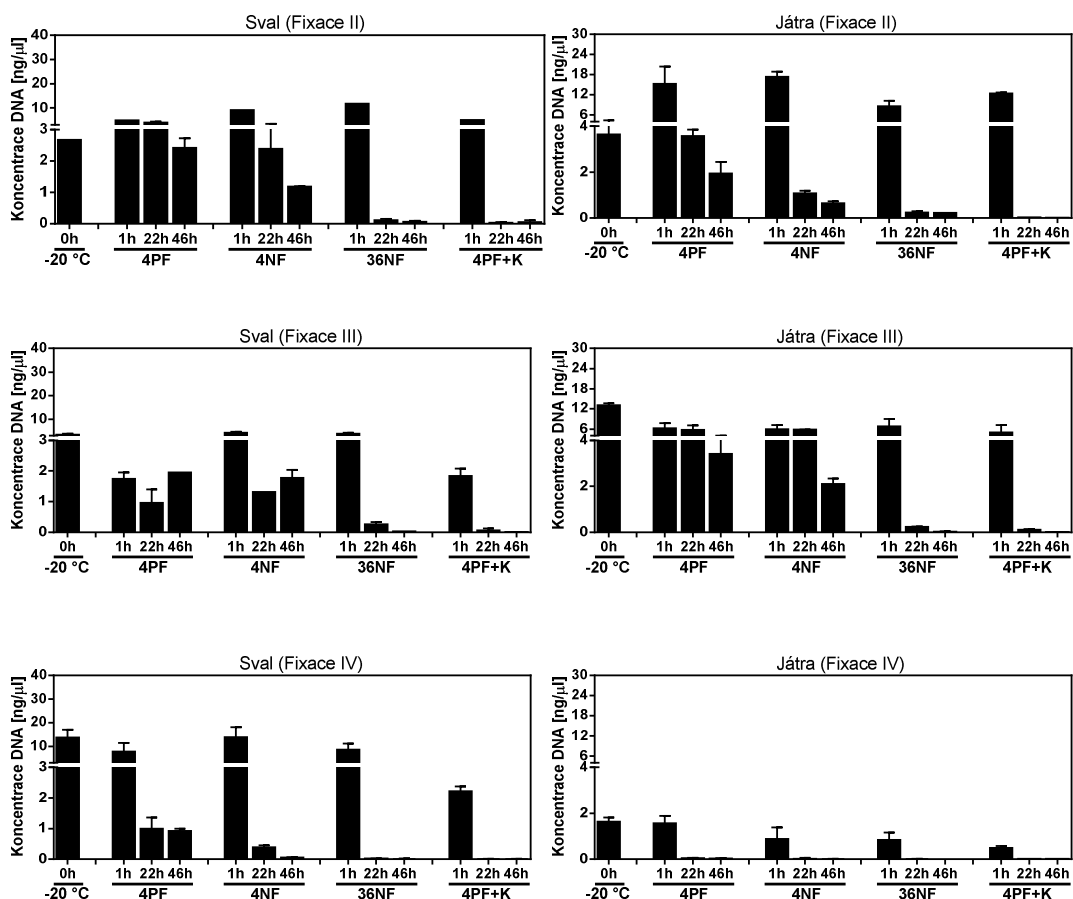
Stanovení koncentrace DNA pomocí fluorometrického měření (3.2.6), jež je založeno na detekci fluorescence závislé na množství DNA ve vzorku, bylo prováděno pomocí kitu Qubit dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen, USA) na spektrometru BioSpectrometer (Eppendorf, Německo). Koncentrace DNA byla stanovena u vzorků jater a svalů fixovaných v jednotlivých roztocích po dobu 1 hod., 22 hod. a 46 hod. Hodnoty koncentrace DNA v grafech (Obrázek 9) jsou znázorněny jako průměry dvou hodnot z jednotlivých měření vzorků A a B a jejich směrodatné odchylky.

Z Obrázku 9 je patrné, že u všech fixací (Fixace II, III, IV) u obou měřených tkání jsou výtěžky DNA v 1 hod. fixace v podstatě shodné pro všechny použité roztoky. S prodloužením fixace na 22 hod. a 46 hod. dochází k snížení výtěžků. Toto snížení je v případě roztoku 4PF relativně mírné, v případě roztoku 4NF je lehce výraznější a v případě roztoků 36NF a 4PF+K již nebyla detekována téměř žádná DNA.

Při porovnání Fixace IV s Fixací II a III je patrné, že absolutní výtěžky DNA u jater z Fixace IV jsou celkově malé. Nižší výtěžky byly naměřeny u kontroly a vzorků fixovaných 1 hod., a to v případě všech fixačních roztoků; u 22 hod. a 46 hod. fixace již DNA není detekovatelná téměř vůbec, a to opět v případě všech fixačních roztoků (dokonce i u roztoků 4PF a 4NF) (Obrázek 9). Dále je u jaterní tkáně vidět, že relativní snížení výtěžků DNA mezi kontrolou a vzorky fixovanými roztoky 4PF a 4NF po 22 hod. a 46 hod. bylo mnohem výraznější u Fixace IV oproti Fixacím II a III (Obrázek 9).

U svalové tkáně Fixace IV byly výtěžky u kontrol a vzorků fixovaných po čas 1 hod. všemi roztoky srovnatelné s Fixací II a III. Rozdíl Fixace IV oproti Fixacím II a III však byl v relativním snížení výtěžků DNA mezi kontrolou a roztoky 4PF a 4NF v časech 22 hod. a 46 hod., které se u Fixace IV projevovalo výrazněji než u Fixací II a III (Obrázek 9). U svalové tkáně jsou při použití roztoků 36NF a 4PF+K výtěžky DNA v časech 22 hod. a 46 hod. ve všech experimentech velmi nízké, tudíž toto rozdílné relativní snížení výtěžků oproti kontrole není tak výrazné.

Srovnání výsledků získaných metodou qPCR a fluorometrickým měřením je znázorněno v souhrnném obrázku v Příloze (Obrázek P1). Obě metody poskytují v zásadě srovnatelné výsledky s výjimkou tkání (sval a játra) fixovaných 1 hod. v roztoku 4PF+K, kde fluorometrické měření stanovilo výrazně vyšší koncentraci DNA (s výjimkou jater u Fixace IV).



Obrázek 9: Koncentrace vyizolované DNA stanovená fluorometrickým měřením v závislosti na délce fixace. Vzorky z tkáně svalů a jater od tří dárců z Fixace II, III a IV (Fixace II: muž, 50–60 let, PMI 7 dní; teplotní profil: 5 dní 6–10 °C; 2 hod. RT; 48 hod. 4 °C; Fixace III: muž, 82 let, PMI 4 dny; teplotní profil: 3 dny 6–10 °C; 2 hod. RT; 24 hod. 4 °C; Fixace IV: žena, 60 let, PMI 5–6 dní; teplotní profil: 3–4 dny RT, 1 den 6–10 °C; 2 hod. RT; 24 hod. 4 °C) byly fixovány po dobu 1 hod, 22 hod. a 46 hod. v roztocích: 4% (v/v) pufrovaný formaldehyd (4PF), 4% (v/v) nepufrovaný formaldehyd (4NF), 36% (v/v) nepufrovaný formaldehyd (36NF) a 4% (v/v) pufrovaný formaldehyd s 4% (v/v) kyselinou mravenčí (4PF+K). Jako kontrola sloužila tkáň nefixovaná a zmražená na -20 °C, jedná se tedy o čas 0 hod. Poté byla ze vzorků vyizolována DNA a její koncentrace byla stanovena fluorometrickým měřením. Hodnoty koncentrace DNA v grafech jsou znázorněny jako průměry dvou hodnot ze vzorků A a B a jejich směrodatné odchylky.

4.1.3 Stanovení koncentrace a míry fragmentace DNA pomocí čipové elektroforézy na bioanalyzáru Agilent 2100

Stanovení koncentrace DNA, jež proběhlo na čipové elektroforéze (3.2.7), je založeno na detekci fluorescence závislé na množství DNA ve vzorku. Zároveň také dochází k elektroforetickému rozdělení fragmentů DNA podle velikosti. Koncentrace DNA se tedy stanovuje pro jednotlivé fragmenty, nikoli pro celkovou DNA ve vzorku. Koncentrace jednotlivých fragmentů a jejich délka nám podávají informaci o míře fragmentace DNA ve vzorku. Měření bylo provedeno pomocí kitu Agilent High Sensitivity DNA (Agilent Technologies, USA) na přístroji bioanalyzáru Agilent 2100 (Agilent Technologies, USA). Koncentrace DNA byla stanovena u vzorků jater a svalů fixovaných v jednotlivých roztocích po dobu 1 hod., 22 hod. a 46 hod. spolu s kontrolním vzorkem, jímž byla tkáň zmražená na -20 °C – jedná se tedy o čas 0 hod. bez jakéhokoli ošetření fixačním činidlem. Před měřením byly vzorky příslušně ředěny nebo koncentrovány, tak aby se vešly do detekčního pásma metody.

Ačkoli je zřetelná přítomnost delších fragmentů (cca 2 000–10 380 bp), elektroforetogram zobrazuje i relativně významné koncentrace delších fragmentů DNA (avšak ty jsou mimo rozsah standardu použitého kitu, protože 10 380 bp je maximum standardu), přítomnost kratších fragmentů nebyla většinou detekována (pokud ano, tak především u jaterní tkáně). To může být způsobeno tím, že se fragmenty DNA o kratších délkách ve vzorcích vůbec nenacházejí, a nebo tím, že se ve vzorcích nacházejí v nižších koncentracích, a tudíž nejsou vidět.

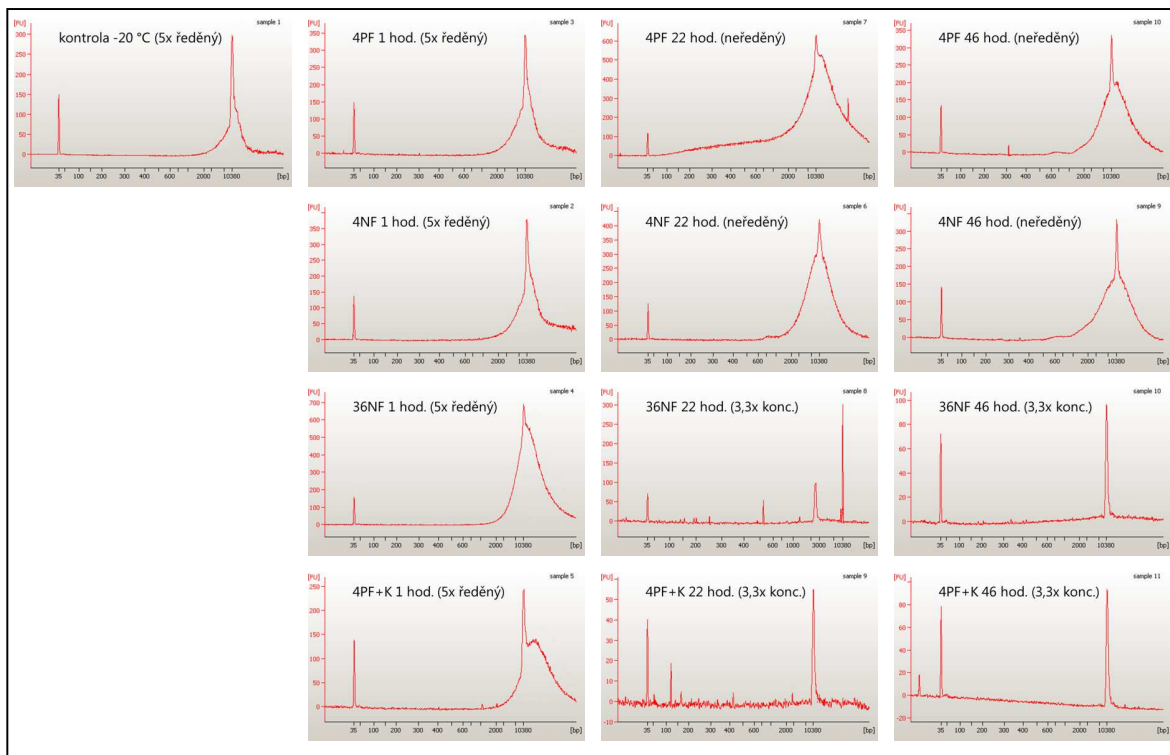
V případě všech fixací (Fixace II, III, IV) je u obou tkání (Obrázky 10 a 11) patrné, že vzorky fixované všemi roztoky po dobu 1 hod. obsahují detekovatelnou DNA. V případě prodloužení fixace na 22 hod. až 46 hod. zpravidla dochází u vzorků fixovaných roztoky 4PF a 4NF ke snižování koncentrace DNA, nicméně ta je stále detekovatelná, zatímco u vzorků fixovaných roztoky 36NF a 4PF+K již DNA detekovatelná není.

Při porovnání Fixace IV s Fixací II a III je patrné, že absolutní výtěžky DNA u jaterní tkáně z Fixace IV jsou celkově malé. Nižší výtěžky byly naměřeny u kontroly a vzorků fixovaných 1 hod., a to v případě všech fixačních roztoků; u fixace 22 hod. a 46 hod. již DNA není detekovatelná téměř vůbec, a to i u roztoků 4PF a 4NF (Obrázek 11).

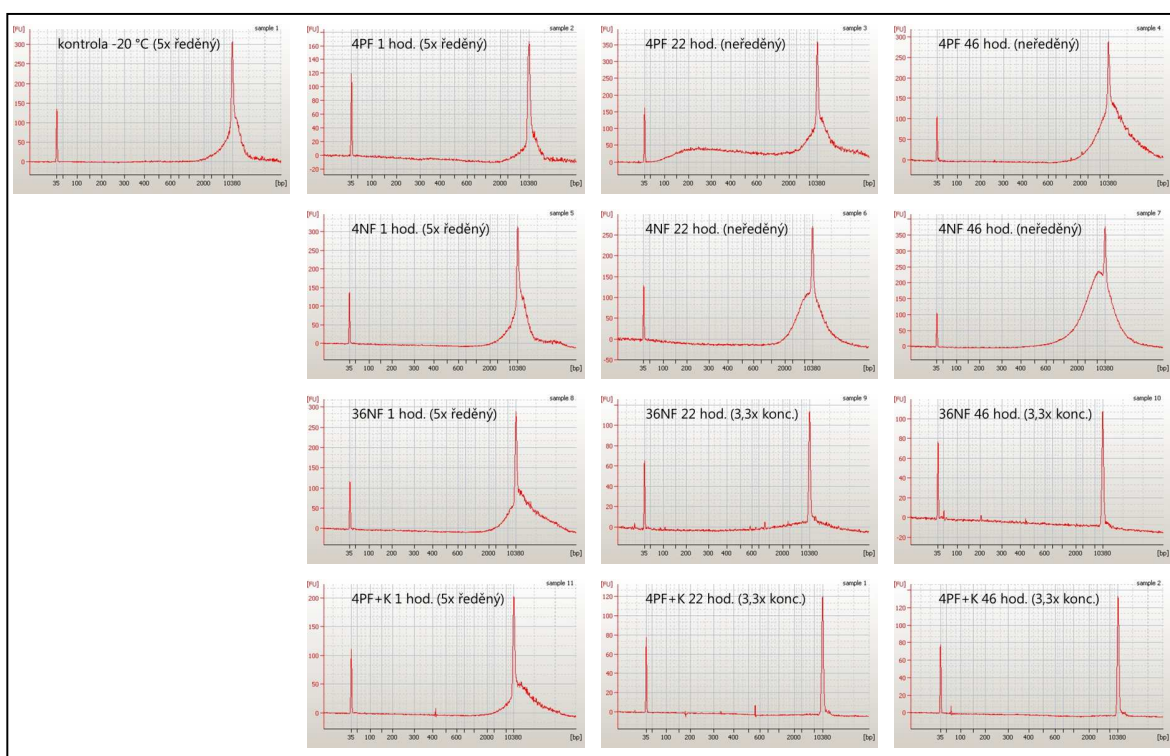
U svalové tkáně Fixace IV byly výtěžky u kontrol a vzorků fixovaných po čas 1 hod. všemi roztoky srovnatelné s Fixací II a III. Naproti tomu vzorky svalové tkáně fixované po

dobu 22 hod. a 46 hod. v roztoku 4NF poskytovaly nižší výtěžky u Fixace IV oproti Fixacím II a III (Obrázek 10).

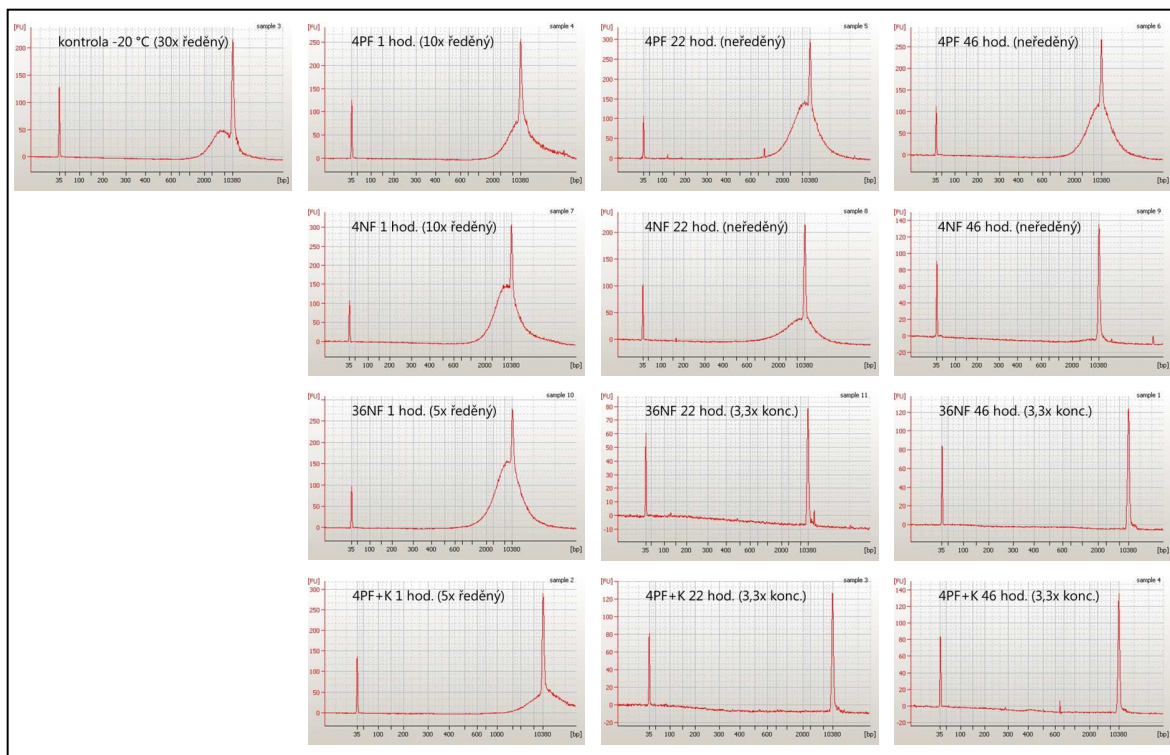
Fixace II (Sval)



Fixace III (Sval)

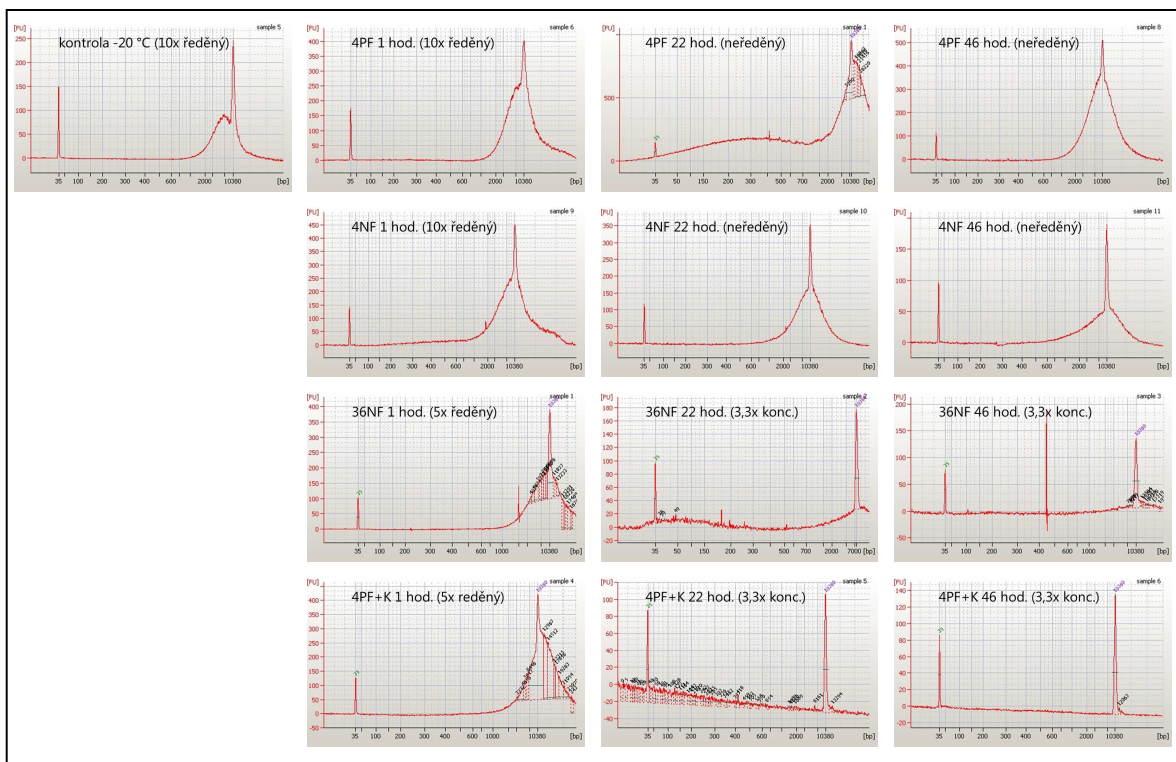


Fixace IV (Sval)

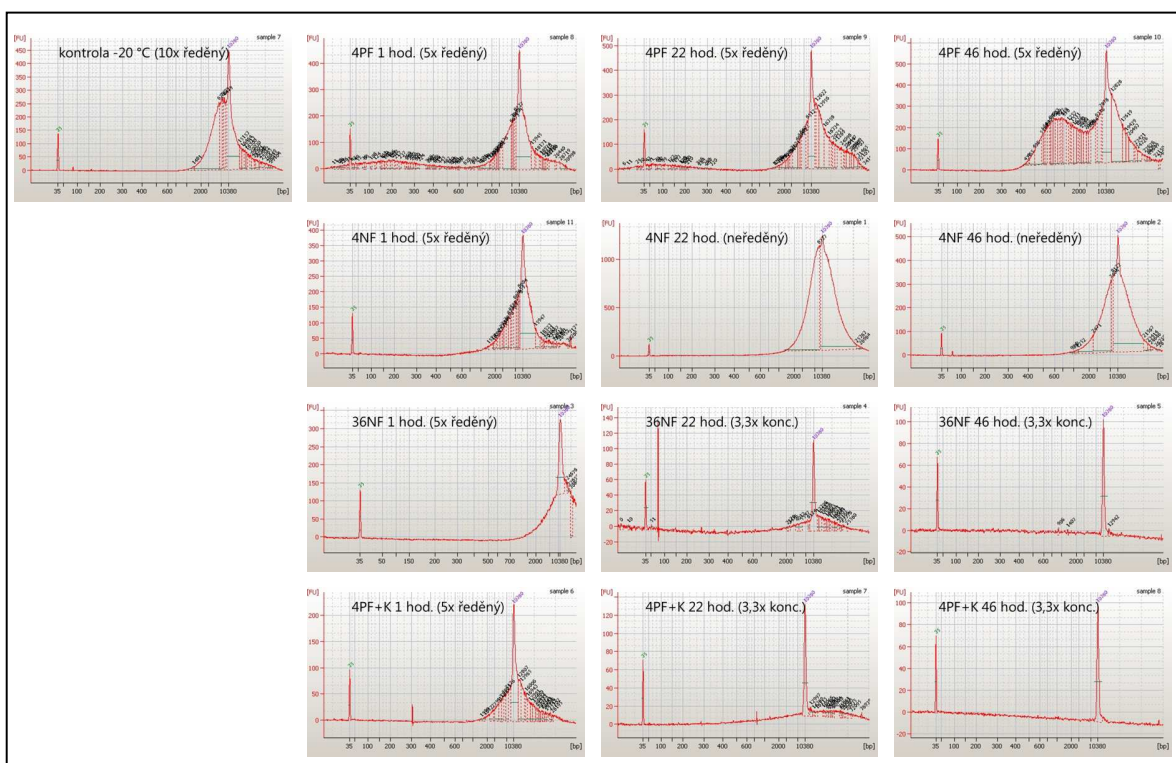


Obrázek 10: Množství a míra fragmentace DNA vyizolované ze svalové tkáně stanovená pomocí čipové elektroforézy v závislosti na použitém roztoku a délce fixace. Vzorky ze svalové tkáně tří dárců z Fixace II, III a IV (Fixace II: muž, 50–60 let, PMI 7 dní; teplotní profil: 5 dní 6–10 °C; 2 hod. RT; 48 hod. 4 °C; Fixace III: muž, 82 let, PMI 4 dny; teplotní profil: 3 dny 6–10 °C; 2 hod. RT; 24 hod. 4 °C; Fixace IV: žena, 60 let, PMI 5–6 dní; teplotní profil: 3–4 dny RT, 1 den 6–10 °C; 2 hod. RT; 24 hod. 4 °C) byly fixovány po dobu 1 hod, 22 hod. a 46 hod. v roztocích: 4% (v/v) pufrovaný formaldehyd (4PF), 4% (v/v) nepufrovaný formaldehyd (4NF), 36% (v/v) nepufrovaný formaldehyd (36NF) a 4% (v/v) pufrovaný formaldehyd s 4% (v/v) kyselinou mravenčí (4PF+K). Jako kontrola sloužila tkáň nefixovaná a zmražená na -20 °C, jedná se tedy o čas 0 hod. Poté byla ze vzorků vyizolována DNA a pomocí čipové elektroforézy na bioanalyzáru Agilent 2100 (Agilent Technologies, USA) byla analyzována její koncentrace a míra fragmentace. Zobrazeny jsou výsledné elektroforetogramy. Na ose x je vynesena délka fragmentů DNA [bp], na ose y je vynesena intenzita signálu [FU]. FU = fluorescence unit (fluorescenční jednotka).

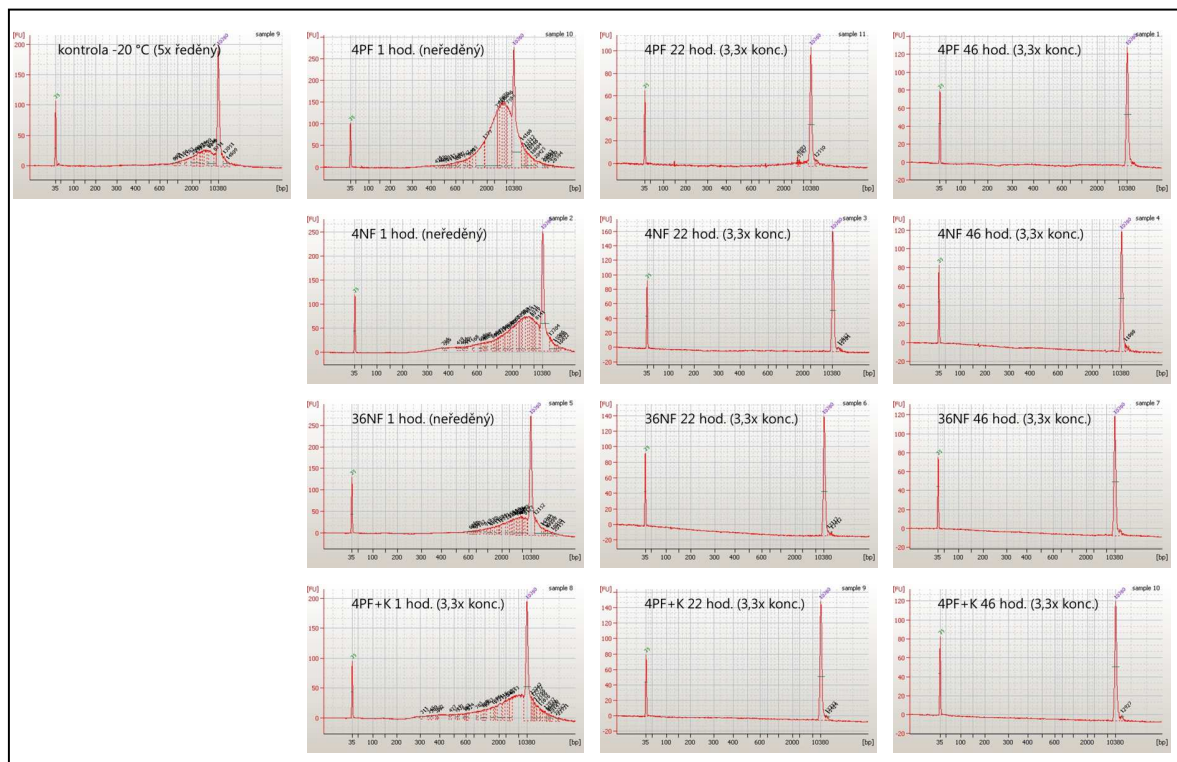
Fixace II (Játra)



Fixace III (Játra)



Fixace IV (Játra)



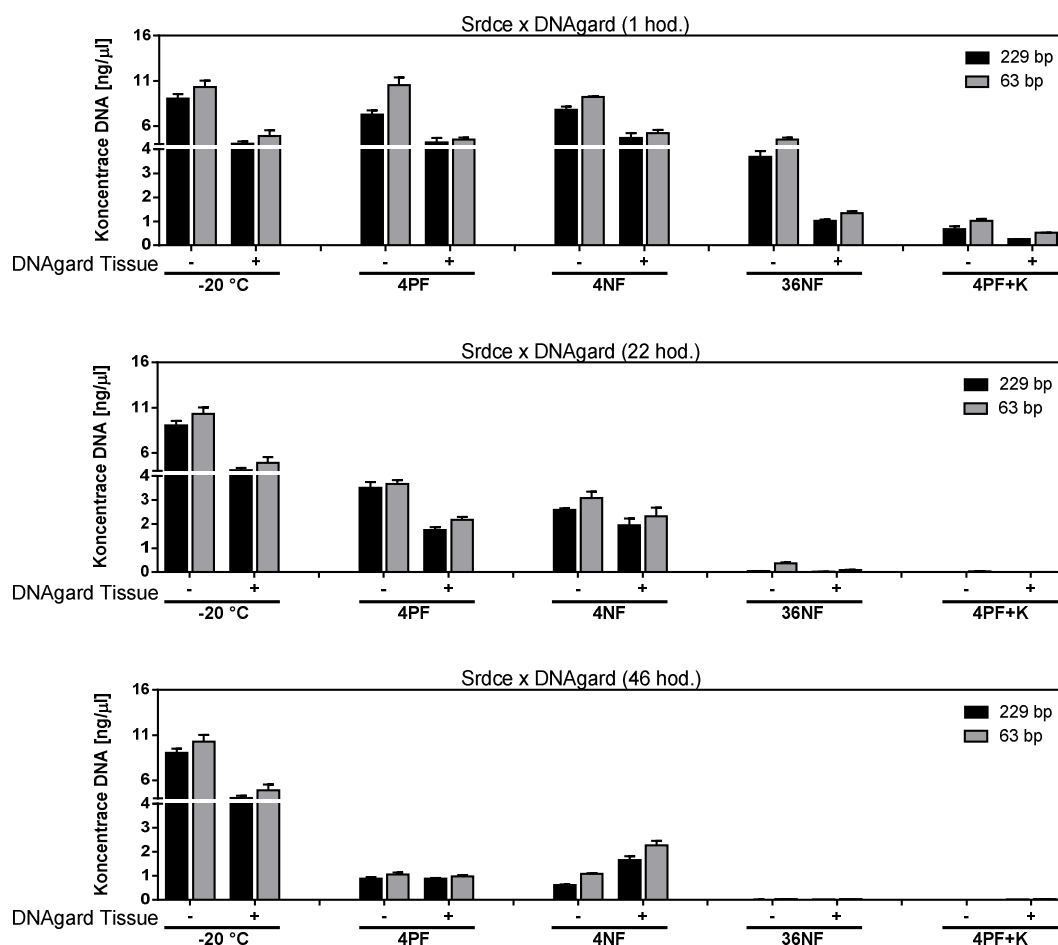
Obrázek 11: Množství a míra fragmentace DNA vyizolované z jaterní tkáně stanovená pomocí čipové elektroforézy v závislosti na použitém roztoku a délce fixace. Vzorky z jaterní tkáně tří dárců z Fixace II, III a IV (Fixace II: muž, 50–60 let, PMI 7 dní; teplotní profil: 5 dní 6–10 °C; 2 hod. RT; 48 hod. 4 °C; Fixace III: muž, 82 let, PMI 4 dny; teplotní profil: 3 dny 6–10 °C; 2 hod. RT; 24 hod. 4 °C; Fixace IV: žena, 60 let, PMI 5–6 dní; teplotní profil: 3–4 dny RT, 1 den 6–10 °C; 2 hod. RT; 24 hod. 4 °C) byly fixovány po dobu 1 hod, 22 hod. a 46 hod. v roztocích: 4% (v/v) pufovaný formaldehyd (4PF), 4% (v/v) nepufovaný formaldehyd (4NF), 36% (v/v) nepufovaný formaldehyd (36NF) a 4% (v/v) pufovaný formaldehyd s 4% (v/v) kyselinou mravenčí (4PF+K). Jako kontrola sloužila tkáň nefixovaná a zmražená na -20 °C, jedná se tedy o čas 0 hod. Poté byla ze vzorků vyizolována DNA a pomocí čipové elektroforézy na bioanalýzáru Agilent 2100 (Agilent Technologies, USA) byla analyzována její koncentrace a míra fragmentace. Zobrazeny jsou výsledné elektroforetogramy. Na ose x je vynesena délka fragmentů DNA [bp], na ose y je vynesena intenzita signálu [FU]. FU = fluorescence unit (fluorescenční jednotka).

4.2 Před- fixační ošetření tkáně roztokem DNAgard Tissue nemá vliv na množství a stupeň fragmentace vyizolované DNA

DNAgard Tissue (Biomatrix, USA) je roztok určený na stabilizaci nevyizolované DNA v tkáňových vzorcích. Bylo ověřeno, zda ošetření vzorku tkáně roztokem DNAgard Tissue (Biomatrix, USA) po 24 hod. před fixací fixačními roztoky 4PF, 4NF, 36NF a 4PF+K má vliv na kvalitu a kvantitu následně izolované DNA. Testované vzorky pocházely ze srdeční tkáně Fixace II (3.1.3) a byly fixovány po dobu 1 hod., 22 hod., a 46 hod.

Hodnoty koncentrace DNA v grafech jsou znázorněny jako průměry čtyř hodnot ze vzorků A a B měřených v duplikátech a jejich směrodatné odchylky. Jako kontrola sloužila tkáň nefixovaná a zmražená na -20 °C, jedná se tedy o čas 0 hod.

Obrázek 12 ukazuje, že ošetření tkání roztokem DNAgard Tissue (Biomatrix, USA) před fixací vede k zisku srovnatelných nebo dokonce nižších výtěžků DNA u všech fixačních roztoků a ve všech sledovaných časech jako u vzorků neošetřených roztokem DNAgard Tissue (Biomatrix, USA). Z měření metodou qPCR tedy vyplynulo, že umístění vzorku tkáně do DNAgard Tissue (Biomatrix, USA) na 24 hod. před fixací nemá výrazně pozitivní vliv na kvalitu a kvantitu vyizolované DNA.



Obrázek 12: Před-fixační ošetření tkáně roztokem DNAGard Tissue (Biomatrica, USA) nemá vliv na množství a míru fragmentace vyizolované DNA. Vzorky ze srdeční tkáně (muž, 50-60 let, PMI 7 dní) byly fixovány po dobu 1 hod., 22 hod. a 46 hod. v roztocích: 4% (v/v) pufrovaný formaldehyd (4PF), 4% (v/v) nepufrovaný formaldehyd (4NF), 36% (v/v) nepufrovaný formaldehyd (36NF) a 4% (v/v) pufrovaný formaldehyd s 4% (v/v) kyselinou mravenčí (4PF+K). Část vzorků byla před fixací 24 hod. inkubována v roztoku DNAGard Tissue (Biomatrica, USA) při RT (v grafech znázorněno znaménkem „+“; neošetřená tkáň je znázorněna znaménkem „-“). Jako kontrola sloužila tkáň nefixovaná a zmražená na -20 °C, jedná se tedy o čas 0 hod. Poté byla ze vzorků vyizolována DNA a její koncentrace byla stanovena qPCR pomocí dvou párů primerů pro lidské Alu sekvence, které tvořily produkty o délkách 229 bp a 63 bp. Hodnoty koncentrace DNA v grafech jsou znázorněny jako průměry čtyř hodnot ze vzorků A a B měřených v duplikátech a jejich směrodatné odchylky.

4.3 Chemické složení fixačního roztoku formaldehydu a délka fixace ovlivňují získání úplného DNA profilu

STR analýza sestává z multiplexové PCR reakce s následným elektroforetickým dělením a fluorescenční detekcí produktů PCR reakce (3.2.8). Výsledkem STR analýzy je stanovení DNA profilu pro identifikační účely. V této práci představovala STR analýza důležitý výstup, protože je rutinně používanou praktickou aplikací na forenzních pracovištích, kde vzorky z tkání fixovaných formaldehydem představují nestandardní materiál.

Měření bylo provedeno pomocí kitu AmpFLSTR NGM Select (Applied Biosystems, USA) na přístroji DNA analyzátor ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA). Tento kit stanovuje alely u 17 lokusů napříč DNA (16 autozomálních + 1 gonozomální) měřených ve 4 fluorescenčních kanálech. Délka amplikonů je do 450 bp. V případě, že je vstupní DNA fragmentována či jinak modifikována, dochází k horší amplifikaci, a tedy i následné zhoršené detekci amplikonů, což se projevuje snížením výšky píku až jeho vymizením (alelický drop-out). Čím delší amplikon, tím větší je jeho citlivost na výše uvedené jevy.

STR profily byly stanoveny u jaterní a svalové tkáně fixované po dobu 1 hod., 22 hod. a 46 hod. v roztocích 4PF, 4NF, 36NF a 4PF+K. Jako kontrolní vzorek sloužila tkáň zmražená na -20 °C, jedná se tedy o čas 0 hod. bez jakéhokoli ošetření fixačním činidlem. Pro přehlednost jsou reprezentativní elektroforetogramy obou tkání z Fixace IV z jednoho detekčního kanálu uvedeny v Příloze (Obrázek P2 a P3).

Nejprve byla ohodnocená celková korektnost získaného STR profilu (Tabulka 8). Stanoven byl počet lokusů s korektními výsledky, tj. kde byly detekovány pouze správné alely; dále počet lokusů s chybějícími alelami u heterozygotů, tj. kde byla detekována pouze jedna ze dvou původních alel heterozygotů (projev jako „falešný homozygot“); dále počet lokusů se špatnými výsledky, tj. kde byly detekovány nekorektní alely a chybějící alely u heterozygotů; a nakonec lokusy s žádnými výsledky, kde nebyly detekovány žádné alely. U Fixace II a III byly jiné než korektní výsledky zpravidla přítomny pouze ve vzorcích fixovaných roztoky 36NF a 4PF+K po dobu 22 hod. a 46 hod. Fixace IV vykazuje celkově nižší korektnost výsledků a v případě jaterní tkáně byly nekorektní výsledky detekovány dokonce již při fixaci 22 hod. roztokem 4PF.

Tabulka 8: Vliv složení fixačního roztoku a délky fixace na kvalitu STR profilu. Vzorky svalu a jater (Fixace II: muž, 50–60 let, PMI 7 dní; teplotní profil: 5 dní 6–10 °C; 2 hod. RT; 48 hod. 4 °C; Fixace III: muž, 82 let, PMI 4 dny; teplotní profil: 3 dny 6–10 °C; 2 hod. RT; 24 hod. 4 °C; Fixace IV: žena, 60 let, PMI 5–6 dní; teplotní profil: 3–4 dny RT, 1 den 6–10 °C; 2 hod. RT; 24 hod. 4 °C) byly fixovány 1 hod, 22 hod. a 46 hod. v roztocích: 4% (v/v) pufovaný formaldehyd (4PF), 4% (v/v) nepufovaný formaldehyd (4NF), 36% (v/v) nepufovaný formaldehyd (36NF) a 4% (v/v) pufovaný formaldehyd s 4% (v/v) kyselinou mravenčí (4PF+K). Kontrola byla tkáň nefixovaná a zmražená na -20 °C (0 hod.). Následně byla provedena STR analýza. Úplný STR profil sestává ze 17 detekovaných produktů u 17 lokusů. Tabulka ukazuje počty lokusů s: korektními výsledky = detekovány pouze správné alely (zeleno-červená škála, kde 100 % odpovídá pouze správným výsledkům (zelená) a 0 % odpovídá pouze chybným výsledkům (červená)); chybějícími alelami u heterozygotů = detekována pouze jedna ze dvou původních alel heterozygotů, tj. projev jako „falešný homozygot“; špatnými výsledky = detekovány nekorektní alely a chybějící alely u heterozygotů; žádnými výsledky = nedetekovány žádné alely (zeleno-červená škála, kde 0 % odpovídá pouze správným výsledkům (zelená) a 100 % odpovídá pouze chybným výsledkům (červená)).

| | | | | | | Počet lokusů | Lokusy s korektními výsledky | Chybějící alely u heterozygotů (falešný homozygot) | Lokusy se špatnými výsledky | Lokusy s žádnými výsledky |
|------------|--|--|--|--|--|--------------|------------------------------|--|-----------------------------|---------------------------|
| Fixace II | | | | | | | | | | |
| | | | | | | -20 °C | 17 | 100% | 0% | 0% |
| | | | | | | 4PF 1 h | 17 | 100% | 0% | 0% |
| | | | | | | 22 h | 17 | 100% | 0% | 0% |
| | | | | | | 46 h | 17 | 100% | 0% | 0% |
| | | | | | | 4NF 1 h | 17 | 100% | 0% | 0% |
| | | | | | | 22 h | 17 | 100% | 0% | 0% |
| | | | | | | 46 h | 17 | 100% | 0% | 0% |
| | | | | | | 36NF 1 h | 17 | 100% | 0% | 0% |
| | | | | | | 22 h | 17 | 94% | 6% | 0% |
| | | | | | | 46 h | 17 | 41% | 0% | 59% |
| | | | | | | 4PF+K 1 h | 17 | 100% | 0% | 0% |
| | | | | | | 22 h | 17 | 47% | 18% | 29% |
| | | | | | | 46 h | 17 | 0% | 12% | 82% |
| | | | | | | -20 °C | 17 | 100% | 0% | 0% |
| | | | | | | 4PF 1 h | 17 | 100% | 0% | 0% |
| | | | | | | 22 h | 17 | 100% | 0% | 0% |
| | | | | | | 46 h | 17 | 100% | 0% | 0% |
| | | | | | | 4NF 1 h | 17 | 100% | 0% | 0% |
| | | | | | | 22 h | 17 | 100% | 0% | 0% |
| | | | | | | 46 h | 17 | 100% | 0% | 0% |
| | | | | | | 36NF 1 h | 17 | 100% | 0% | 0% |
| | | | | | | 22 h | 17 | 100% | 0% | 0% |
| | | | | | | 46 h | 17 | 100% | 0% | 0% |
| | | | | | | 4PF+K 1 h | 17 | 100% | 0% | 0% |
| | | | | | | 22 h | 17 | 0% | 6% | 18% |
| | | | | | | 46 h | 17 | 6% | 24% | 59% |
| Fixace III | | | | | | | | | | |
| | | | | | | -20 °C | 17 | 100% | 0% | 0% |
| | | | | | | 4PF 1 h | 17 | 100% | 0% | 0% |
| | | | | | | 22 h | 17 | 100% | 0% | 0% |
| | | | | | | 46 h | 17 | 100% | 0% | 0% |
| | | | | | | 4NF 1 h | 17 | 100% | 0% | 0% |
| | | | | | | 22 h | 17 | 100% | 0% | 0% |
| | | | | | | 46 h | 17 | 100% | 0% | 0% |
| | | | | | | 36NF 1 h | 17 | 100% | 0% | 0% |
| | | | | | | 22 h | 17 | 100% | 0% | 0% |
| | | | | | | 46 h | 17 | 100% | 0% | 0% |
| | | | | | | 4PF+K 1 h | 17 | 100% | 0% | 0% |
| | | | | | | 22 h | 17 | 94% | 6% | 0% |
| | | | | | | 46 h | 17 | 100% | 0% | 0% |
| | | | | | | -20 °C | 17 | 100% | 0% | 0% |
| | | | | | | 4PF 1 h | 17 | 100% | 0% | 0% |
| | | | | | | 22 h | 17 | 100% | 0% | 0% |
| | | | | | | 46 h | 17 | 100% | 0% | 0% |
| | | | | | | 4NF 1 h | 17 | 100% | 0% | 0% |
| | | | | | | 22 h | 17 | 100% | 0% | 0% |
| | | | | | | 46 h | 17 | 94% | 0% | 6% |
| | | | | | | 36NF 1 h | 17 | 100% | 0% | 0% |
| | | | | | | 22 h | 17 | 76% | 0% | 18% |
| | | | | | | 46 h | 17 | 47% | 12% | 35% |
| | | | | | | 4PF+K 1 h | 17 | 100% | 0% | 0% |
| | | | | | | 22 h | 17 | 65% | 18% | 24% |
| | | | | | | 46 h | 17 | 6% | 6% | 82% |
| Fixace IV | | | | | | | | | | |
| | | | | | | -20 °C | 17 | 100% | 0% | 0% |
| | | | | | | 4PF 1 h | 17 | 100% | 0% | 0% |
| | | | | | | 22 h | 17 | 100% | 0% | 0% |
| | | | | | | 46 h | 17 | 100% | 0% | 0% |
| | | | | | | 4NF 1 h | 17 | 100% | 0% | 0% |
| | | | | | | 22 h | 17 | 100% | 0% | 0% |
| | | | | | | 46 h | 17 | 94% | 0% | 6% |
| | | | | | | 36NF 1 h | 17 | 100% | 0% | 0% |
| | | | | | | 22 h | 17 | 6% | 6% | 88% |
| | | | | | | 46 h | 17 | 0% | 6% | 94% |
| | | | | | | 4PF+K 1 h | 17 | 100% | 0% | 0% |
| | | | | | | 22 h | 17 | 0% | 6% | 24% |
| | | | | | | 46 h | 17 | 6% | 18% | 24% |
| | | | | | | -20 °C | 17 | 100% | 0% | 0% |
| | | | | | | 4PF 1 h | 17 | 100% | 0% | 0% |
| | | | | | | 22 h | 17 | 88% | 0% | 12% |
| | | | | | | 46 h | 17 | 53% | 6% | 29% |
| | | | | | | 4NF 1 h | 17 | 100% | 0% | 0% |
| | | | | | | 22 h | 17 | 35% | 18% | 35% |
| | | | | | | 46 h | 17 | 0% | 6% | 29% |
| | | | | | | 36NF 1 h | 17 | 100% | 0% | 0% |
| | | | | | | 22 h | 17 | 6% | 6% | 88% |
| | | | | | | 46 h | 17 | 0% | 6% | 94% |
| | | | | | | 4PF+K 1 h | 17 | 100% | 0% | 0% |
| | | | | | | 22 h | 17 | 0% | 6% | 24% |
| | | | | | | 46 h | 17 | 6% | 18% | 24% |

Dále byla zjištěna přítomnost korektních alel ve všech lokusech (tj. pouze alel, které byly stanoveny u kontrolního vzorku a nepocházely z případné kontaminující DNA), obecně tedy vliv jednotlivých fixačních roztoků a délky fixace na možnost získat úplný STR profil (Tabulka 9). Konkrétní výšky píků jednotlivých alel v daných lokusech jsou uvedeny v Tabulce 10. V případě Fixace II a III u roztoků 4PF a 4NF ve všech fixačních časech u obou tkání nebyl zaznamenán žádný alelický drop-out, tudíž u těchto roztoků byly získány úplné STR profily. Je ale také patrné, že v případě roztoků 4PF a 4NF u fixačních časů 22 hod. a 46 hod. došlo k výraznějšímu poklesu výšek píků zejména u lokusů s delšími amplikony (v tabulce znázorněné tmavě šedou) než u lokusů s kratšími amplikony (v tabulce znázorněny světle šedou), což svědčí o změnách na DNA.

Zatímco fixace tkání v roztocích 36NF a 4PF+K po dobu 1 hod. shodně s roztoky 4PF a 4NF neovlivnila možnost získat úplné STR profily, prodloužení fixačního času na 22 hod. a 46 hod. již často vedlo k poklesu píků detekovaných alel a k nárůstu výskytu alelických drop-out efektů u obou tkání. Alelický drop-out a nižší výšky píků se opět nacházejí zejména u lokusů s delšími amplikony.

U Fixace IV je obecně zřetelný vyšší výskyt drop-out efektů a pokles výšek píků u detekovaných alel (Tabulky 9 a 10). Drop-out efekty byly navíc zaznamenány již v případě použití roztoku 4PF (u tkáně jater při fixaci po dobu 22 hod. a 46 hod.) a roztoku 4NF (u tkáně svalů při fixaci po dobu 46 hod. a u jaterní tkáně již při fixaci po dobu 22 hod.). U roztoků 36NF a 4PF+K byl jak nárůst výskytu drop-out efektů, tak snížení výšek píků při fixaci 22 hod. a 46 hod. výraznější ve srovnání s Fixací II a III. Vzhledem k tomu, že četné drop-out efekty a nízké výšky píků se vyskytují i u lokusů s krátkými amplikony, lze usuzovat na značné změny DNA, které tedy byly u Fixace IV celkově výraznější než u Fixací II a III.

V tabulce 9 jsou hvězdičkou označena data, která mohou poskytovat falešně pozitivní výsledky vlivem kontaminace alelami schodnými s analyzovaným STR profilem.

[illegible]

Tabulka 10: Vliv složení fixačního roztoku a délky fixace na detekovatelnost jednotlivých alel v STR profilu. Uvedeny jsou hodnoty výšky píků jednotlivých alel v STR profilech v jednotkách RFU (relative fluorescence unit). Znázorněno v zeleno-červené škále (nejlépe detekovatelné alely = zelená až nedetekovatelné (drop-out) alely = červená). h = homozygot.

| | | SE33 | | D2S1338 | | D18S51 | | FGA | | D12S391 | | D16S539 | | D21S11 | | TH01 | | D1S1656 | | WWA | | D8S1179 | | D19S433 | | D3S1358 | | D10S1248 | | Amelogenin | | D22S1045 | | D25441 | | | |
|------------|-------|--------|--------|---------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|--------|---------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|--------|--------|--------|---------|--------|---------|--------|---------|--------|----------|--------|------------|--------|----------|--------|--------|--------|------|---|
| | | Alela1 | Alela2 | Alela1 | Alela2 | Alela1 | Alela2 | Alela1 | Alela2 | Alela1 | Alela2 | Alela1 | Alela2 | Alela1 | Alela2 | Alela1 | Alela2 | Alela1 | Alela2 | Alela1 | Alela2 | Alela1 | Alela2 | Alela1 | Alela2 | Alela1 | Alela2 | Alela1 | Alela2 | Alela1 | Alela2 | Alela1 | Alela2 | Alela1 | Alela2 | | |
| Fixace II | sval | -20 °C | 2859 | 2354 | 4140 | 4149 | 5201 | 4443 | 3287 | 4189 | 5451 | h | 5420 | 5423 | 6952 | 4478 | 5017 | h | 3792 | 4655 | 5902 | 4807 | 5475 | 6893 | 2655 | 4299 | 3893 | 3734 | 5896 | 4057 | 6529 | 6715 | 5514 | 4074 | 4631 | h | |
| | | 1 h | 2468 | 3932 | 3874 | 2937 | 6979 | 5726 | 4364 | 2603 | 3641 | h | 4946 | 4675 | 6722 | 7083 | 4794 | h | 3199 | 3753 | 5505 | 4494 | 4887 | 5842 | 2936 | 2693 | 3174 | 3284 | 7021 | 5292 | 6155 | 6972 | 4787 | 6070 | 3179 | h | |
| | | 22 h | 3324 | 3203 | 2508 | 3131 | 5660 | 6131 | 4676 | 4153 | 3513 | h | 3956 | 3414 | 6819 | 6673 | 4949 | h | 3376 | 3501 | 6215 | 4811 | 6862 | 6990 | 4075 | 3599 | 5926 | 4197 | 6976 | 6428 | 6507 | 6763 | 5593 | 3059 | 3858 | h | |
| | | 46 h | 3334 | 1732 | 2891 | 1842 | 7019 | 6398 | 5244 | 4818 | 5670 | h | 4187 | 3192 | 6794 | 5441 | 3968 | h | 2768 | 3379 | 5246 | 5969 | 4770 | 6564 | 5234 | 5510 | 5197 | 4522 | 7068 | 6991 | 6496 | 7110 | 3434 | 3330 | 3368 | h | |
| | | 1 h | 4069 | 3027 | 5215 | 4081 | 7014 | 5802 | 4519 | 3391 | 3940 | h | 5932 | 5279 | 7021 | 7102 | 4357 | h | 4321 | 4086 | 6979 | 7101 | 6893 | 7072 | 3680 | 3400 | 4323 | 4615 | 7032 | 7075 | 6044 | 7092 | 6052 | 5803 | 3586 | h | |
| | | 22 h | 1930 | 1545 | 2284 | 1994 | 4476 | 2003 | 2498 | 2624 | 3935 | h | 3194 | 3337 | 3023 | 2600 | 5499 | h | 2827 | 2035 | 2447 | 2974 | 3790 | 5827 | 5300 | 5017 | 4275 | 3977 | 4994 | 4691 | 6029 | 5783 | 5352 | 4005 | 4359 | h | |
| | 46 h | 832 | 813 | 818 | 824 | 1223 | 450 | 838 | 437 | 1491 | h | 589 | 785 | 391 | 376 | 6188 | h | 375 | 505 | 149 | 435 | 1467 | 1501 | 3922 | 4482 | 2901 | 2930 | 1950 | 1794 | 4305 | 2623 | 3279 | 2797 | 1275 | h | | |
| | játra | -20 °C | 3445 | 1999 | 3068 | 1834 | 4897 | 3341 | 3743 | 2915 | 4669 | h | 4130 | 2233 | 6685 | 2846 | 5910 | h | 3203 | 1677 | 3811 | 3633 | 6285 | 6663 | 2943 | 6359 | 3317 | 3458 | 6038 | 5572 | 6489 | 6956 | 3559 | 4796 | 3722 | h | |
| | | 1 h | 1282 | 1407 | 1751 | 1119 | 265 | 0 | 0 | 201 | 162 | 1459 | h | 2192 | 1347 | 7699 | 109 | 5504 | h | 699 | 1077 | 902 | 821 | 2250 | 2023 | 5394 | 5966 | 7018 | 5361 | 2335 | 3082 | 3182 | 1864 | 6581 | 6728 | 2248 | h |
| | | 22 h | 109 | 0 | 473 | 150 | 0 | 0 | 146 | 123 | h | 186 | 446 | 122 | 0 | 3022 | h | 0 | 110 | 245 | 218 | 207 | 601 | 1000 | 1311 | 1315 | 1203 | 1648 | 615 | 1079 | 480 | 2373 | 1542 | 438 | h | | |
| | | 46 h | 3772 | 3430 | 5285 | 3418 | 6392 | 5870 | 3681 | 3155 | 5688 | h | 5617 | 4217 | 7065 | 6915 | 5188 | h | 3986 | 3569 | 7220 | 5343 | 6032 | 6701 | 5575 | 5856 | 6316 | 5128 | 6979 | 7006 | 5537 | 5957 | 6213 | 5600 | 3901 | h | |
| | | 4PF+K | 0 | 0 | 0 | 85 | 0 | 0 | 0 | 0 | 113 | h | 122 | 135 | 0 | 0 | 282 | h | 0 | 80 | 214 | 0 | 340 | 97 | 416 | 553 | 199 | 182 | 832 | 924 | 1617 | 477 | 247 | 0 | 163 | h | |
| 46 h | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | h | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | h | 0 | 0 | 0 | 0 | 99 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 149 | 0 | 0 | 0 | 0 | h | | |
| Fixace III | sval | -20 °C | 1010 | 951 | 1423 | 1370 | 1292 | 2764 | 3925 | 3345 | 2398 | h | 2338 | 1526 | 3244 | 1752 | 3041 | h | 1216 | 1124 | 1497 | 1582 | 3491 | 4513 | 2413 | 1701 | 4111 | 3272 | 2226 | 3593 | 2529 | 618 | 2463 | 1661 | 2567 | h | |
| | | 1 h | 4174 | 2620 | 4234 | 3577 | 6342 | 6565 | 6816 | 5782 | 6679 | h | 6812 | 5023 | 6881 | 7048 | 4464 | h | 4542 | 2921 | 5638 | 6478 | 6302 | 7165 | 5715 | 4620 | 5808 | 6210 | 7147 | 6334 | 6426 | 7027 | 6573 | 5564 | 4149 | h | |
| | | 22 h | 2014 | 1467 | 2374 | 1560 | 4126 | 3518 | 3512 | 3522 | 3876 | h | 2941 | 2665 | 5004 | 3025 | 5379 | h | 2185 | 1877 | 3145 | 2957 | 5844 | 5307 | 3365 | 4777 | 4931 | 4937 | 4939 | 4391 | 5988 | 4706 | 4055 | 3907 | 4935 | h | |
| | | 46 h | 1565 | 1633 | 1863 | 1803 | 2575 | 2897 | 3595 | 2328 | 3773 | h | 2257 | 2266 | 3235 | 2490 | 5619 | h | 3378 | 1369 | 2203 | 1637 | 5814 | 4818 | 3037 | 2877 | 3393 | 4820 | 2930 | 4715 | 5132 | 3709 | 3870 | 4657 | h | | |
| | | 1 h | 2652 | 2691 | 4096 | 3591 | 4977 | 5988 | 3871 | 5463 | 6503 | h | 5291 | 3843 | 7125 | 7215 | 5619 | h | 3326 | 3564 | 5981 | 5482 | 6895 | 1441 | 4503 | 3180 | 6827 | 6815 | 6370 | 5801 | 4581 | 4009 | 3569 | 5174 | h | | |
| | | 22 h | 1375 | 1263 | 1313 | 1312 | 1543 | 2196 | 2545 | 2608 | 2469 | h | 2800 | 1414 | 4288 | 1057 | 6144 | h | 2105 | 991 | 785 | 825 | 3006 | 3810 | 6423 | 6028 | 6055 | 4520 | 3050 | 2759 | 6565 | 4609 | 6298 | 3833 | 2730 | h | |
| | játra | -20 °C | 453 | 595 | 218 | 137 | 427 | 215 | 1252 | 1076 | 995 | h | 831 | 333 | 231 | 219 | 6660 | h | 90 | 380 | 154 | 191 | 1549 | 901 | 2885 | 2700 | 3689 | 2739 | 1583 | 1472 | 4434 | 1608 | 2276 | 1617 | 1900 | h | |
| | | 1 h | 1800 | 1258 | 1961 | 1695 | 2274 | 1618 | 3958 | 2901 | 4041 | h | 2318 | 2275 | 2239 | 2776 | 5931 | h | 1792 | 1413 | 2045 | 2426 | 5263 | 4071 | 4177 | 3491 | 3547 | 3363 | 2657 | 3732 | 4343 | 3624 | 4235 | 2889 | 4219 | h | |
| | | 22 h | 1076 | 724 | 1712 | 1903 | 205 | 364 | 264 | 244 | 1621 | h | 2032 | 1678 | 6189 | 270 | 5630 | h | 1430 | 673 | 1152 | 879 | 2345 | 1301 | 4025 | 4136 | 5027 | 3440 | 2865 | 1766 | 3440 | 1294 | 6024 | 6691 | 3020 | h | |
| | | 46 h | 857 | 582 | 1133 | 750 | 120 | 352 | 487 | 283 | 1083 | h | 1342 | 837 | 3189 | 540 | 5557 | h | 851 | 966 | 196 | 730 | 3059 | 1617 | 2596 | 2529 | 4409 | 3985 | 1502 | 947 | 2844 | 1158 | 6574 | 5720 | 2041 | h | |
| | | 1 h | 3545 | 2988 | 4897 | 3690 | 5313 | 5600 | 4885 | 3644 | 6678 | h | 6502 | 4484 | 7284 | 4144 | 4987 | h | 3695 | 4272 | 6144 | 4682 | 6953 | 7073 | 5662 | 6053 | 6758 | 6527 | 6608 | 6485 | 6071 | 6891 | 6500 | 6022 | 5065 | h | |
| | | 4PF+K | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | h | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | h | 0 | 178 | 0 | 0 | 323 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | h |
| 46 h | 0 | 0 | 0 | 108 | 0 | 0 | 0 | 0 | 87 | h | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | h | 0 | 0 | 0 | 0 | 152 | 279 | 0 | 0 | 152 | 147 | 0 | 110 | 118 | 263 | 0 | 0 | 224 | 0 | h | | |
| Fixace IV | sval | -20 °C | 3602 | 2940 | 5477 | 6834 | 4544 | 6002 | 3277 | 3001 | 4065 | h | 5191 | 6065 | 7197 | 7171 | 5438 | 6432 | 4478 | 3374 | 5496 | 5825 | 7153 | 7212 | 4709 | 3467 | 7035 | h | 7097 | h | 6484 | 7219 | 5814 | 4572 | 4857 | h | |
| | | 1 h | 3316 | 3814 | 5262 | 4548 | 6186 | 5369 | 4309 | 2565 | 4467 | h | 7173 | 5560 | 7137 | 6686 | 4620 | 4993 | 3725 | 3572 | 7228 | 5794 | 7105 | 6649 | 3536 | 3057 | 6524 | h | 7104 | h | 6683 | 7106 | 4205 | 5461 | 4170 | h | |
| | | 22 h | 1642 | 1899 | 2252 | 2193 | 4140 | 4721 | 2694 | 3152 | 2442 | h | 2295 | 1371 | 4707 | 3880 | 1534 | 1655 | 2802 | 1355 | 4835 | 3934 | 4675 | 5442 | 2406 | 1523 | 4409 | h | 7155 | h | 6706 | 5006 | 2547 | 1629 | 3399 | h | |
| | | 46 h | 2465 | 1857 | 3781 | 3344 | 4007 | 5851 | 4886 | 3335 | 3219 | h | 2508 | 1674 | 7047 | 6136 | 1611 | 1140 | 2722 | 1982 | 5118 | 4681 | 5395 | 7216 | 3349 | 2752 | 6574 | h | 7046 | h | 6638 | 6857 | 1774 | 2738 | 4817 | h | |
| | | 1 h | 3881 | 4525 | 5175 | 4767 | 7180 | 7053 | 4144 | 5343 | 3925 | h | 7071 | 6751 | 6451 | 7085 | 6759 | 4748 | 3281 | 4843 | 7132 | 7167 | 6719 | 7027 | 3650 | 3653 | 6954 | h | 7155 | h | 6855 | 6464 | 5862 | 3673 | 4401 | h | |
| | | 22 h | 1717 | 1824 | 2686 | 1922 | 4054 | 3167 | 3036 | 3214 | 4119 | h | 3414 | 2426 | 3039 | 2881 | 2675 | 1677 | 1365 | 1971 | 3681 | 3032 | 5769 | 7089 | 4564 | 3326 | 7150 | h | 6786 | h | 6769 | 6625 | 2576 | 1790 | 4349 | h | |
| | játra | -20 °C | 1576 | 1173 | 2855 | 1522 | 1792 | 1747 | 1731 | 2719 | 2084 | h | 2401 | 2144 | 1834 | 1252 | 6531 | 5822 | 1502 | 1421 | 1798 | 1165 | 5711 | 5513 | 6417 | 5012 | 6624 | h | 6766 | h | 6683 | 7076 | 4479 | 2614 | 3479 | h | |
| | | 1 h | 3283 | 3123 | 3262 | 2834 | 5661 | 5119 | 5302 | 4103 | 4791 | h | 2795 | 4627 | 5314 | 5957 | 5100 | 4496 | 3861 | 2827 | 6893 | 5869 | 7151 | 7094 | 4510 | 5193 | 7010 | h | 6997 | h | 6641 | 7175 | 3743 | 5005 | 4245 | h | |
| | | 22 h | 450 | 523 | 964 | 604 | 234 | 601 | 234 | 292 | 636 | h | 477 | 583 | 186 | 362 | 4644 | 5051 | 374 | 181 | 200 | 1052 | 1112 | 1047 | 3350 | 2639 | 6622 | h | 3328 | h | 3243 | 1325 | 2894 | 2987 | 2087 | h | |
| | | 46 h | 162 | 211 | 940 | 618 | 489 | 248 | 265 | 607 | 621 | h | 476 | 712 | 1057 | 783 | 945 | 956 | 645 | 556 | 1121 | 732 | 2253 | 2068 | 887 | 696 | 2044 | h | 4558 | h | 2262 | 2656 | 151 | 725 | 2390 | h | |
| | | 1 h | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

5 Diskuze

Fixace tkání formaldehydem a následné zalití do parafínového bločku je rozšířenou metodou používanou v patologické a lékařsko-soudní praxi. Ačkoliv je formaldehyd pro své vlastnosti výtečným fixačním činidlem pro histologickou analýzu, v případě aplikace molekulárně biologických metod přináší jeho použití problémy. Z formaldehydem zafixované tkáně se DNA jednak hůře izoluje (zhoršené štěpení tkáně, inhibice izolačních technik, kovalentní vazba DNA na proteiny) a jednak je tato DNA chemicky a fyzicky modifikována (kovalentní vazba DNA na proteiny, fragmentace, modifikace primární sekvence). Tyto problémy nezpůsobuje pouze formaldehyd, ale i produkty vznikající jeho rozkladem, zejména kyselina mravenčí (Fox *et al.*, 1985; Koshiba *et al.*, 1993). Dopady těchto komplikací se dají snížit dvěma způsoby: optimalizací fixačního postupu nebo optimalizací izolačního postupu.

V rámci této práce byl nejprve proveden dotazníkový výzkum pracovišť soudního lékařství a patologie v České republice. Na základě tohoto dotazníku bylo rozhodnuto o provedení experimentů v časových bodech 1 hod., 22 hod. a 46 hod. Dále bylo rozhodnuto o použití několika fixačních roztoků založených na formaldehydu tak, aby byly simulovány různé chemické stavy formaldehydu používaného k fixacím. Byly provedeny celkem čtyři na sobě nezávislé fixace: Fixace I, Fixace II, Fixace III a Fixace IV. Fixace I sloužila jako pilotní experiment. Níže diskutované závěry obecně platí pro Fixace II, III, IV, Fixace IV však vykazovala specifika, která budou diskutována samostatně dále v textu.

Při porovnání výsledků získaných metodou qPCR, fluorometrickým měřením i pomocí čipové elektroforézy z naší práce vyplynulo, že fixační roztoky u vzorků fixovaných již po 1 hod. mohou částečně snižovat množství a zvyšovat degradaci DNA oproti kontrole, nicméně možnost stanovit úplný DNA profil pomocí STR analýzy nebyla ovlivněna.

Pokud byly fixační časy prodlouženy na 22 hod. a 46 hod. došlo již zpravidla k výraznějšímu snížení koncentrace vyizolované DNA a také její vyšší fragmentaci (s výjimkou roztoku 4PF) oproti kontrole. Jednotlivé roztoky se však v míře svých účinků lišily. Zatímco roztoky 4PF a 4NF způsobovaly pouze částečné snížení koncentrace DNA a její fragmentaci pouze mírně (4NF) nebo vůbec (4PF), roztoky 36NF a 4PF+K již způsobovaly téměř absolutní snížení koncentrace DNA a vysokou míru fragmentace. To se následně projevilo i na možnosti získat úplný STR profil. Zatímco v případě vzorků

fixovaných roztoky 4PF a 4NF bylo většinou možné získat úplný STR profil, u vzorků fixovaných roztoky 36NF a 4PF+K již tomu tak zpravidla nebylo.

Vzhledem k tomu, že ani tak agresivní činidla jako roztok 36NF a 4PF+K při fixaci po dobu 1 hod. nepůsobily na celkovou kvalitu DNA natolik výrazně negativně, že by nebylo možno získat úplný STR profil, a vzhledem k tomu, že odborná literatura ukazuje u tkání fixovaných formaldehydem časově závislé snížení výtěžků při srovnání s tkáněmi zamraženými (Ferrer *et al.*, 2007; Hansen *et al.*, 2014; Khoja *et al.*, 2012), je možné, že při takto krátkém fixačním čase nedošlo k plnému zafixování vzorků, a tedy projevu všech negativních účinků daných roztoků. Toto podporuje i fakt, že formaldehyd, ač rychle proniká do tkání, fixuje pomalu (Fox *et al.*, 1985). V tomto případě by tedy bylo vhodné provést srovnání výtěžků a kvality DNA u stejně připravených vzorků (fixovaných pouze po 1 hod.), které by následně byly uchovávány po delší dobu, aby bylo možné posoudit případně nedostatečné zafixování tkání.

Výrazný vliv roztoků 36NF a 4PF+K na parametry vyizolované DNA je pravděpodobně způsoben jejich negativním působením na molekulu DNA. U roztoku 36NF lze předpokládat, že se naplno projevují všechny výše uvedené mechanismy, jimiž formaldehyd sám o sobě nebo prostřednictvím produktů rozkladu modifikuje DNA (standardně se pro fixaci tkání používá formaldehyd 4% a pufrovaný, roztok 36NF je formaldehyd 36% a nepufrovaný) (Fox *et al.*, 1985; Koshiba *et al.*, 1993).

Roztok 4PF+K potom představuje extrémně znehodnocený formaldehyd. Byl připraven přidáním kyseliny mravenčí do roztoku pufrovaného formaldehydu, neboť ta vzniká jeho rozkladem (Fox *et al.*, 1985). Kyselina mravenčí snižuje pH roztoku formaldehydu a toto nízké pH způsobuje degradaci DNA, jež zahrnuje uvolňování purinů a pyrimidinů z molekul DNA a štěpení fosfodiesterové vazby (Koshiba *et al.*, 1993; Williams *et al.*, 1999). Bylo tedy možné předpokládat, že degradace DNA bude v tomto případě značná, což bylo potvrzeno nejen u stanovení kvality a kvantity DNA jednotlivými postupy, ale také u STR analýzy, kde při dlouhodobějším působení tohoto roztoku nebylo možné získat úplný DNA profil.

Přestože výše zmíněné trendy platily u všech experimentů (Fixace II, III, IV), byl u Fixace IV patrný větší vliv fixačních činidel na množství a míru degradace vyizolované DNA než u Fixace II a III. Tento efekt se projevil tak, že ačkoli byly výtěžky a degradace DNA při fixaci po dobu 1 hod. a u kontrol srovnatelné s Fixacemi II a III (u všech tkání vyjma jater), následně u Fixace IV došlo k výraznějšímu úbytku DNA oproti kontrolám při fixaci roztoky 4PF a 4NF po dobu 22 hod. a 46 hod. než při stejném dlouhém působení

těchto roztoků v rámci Fixace II a III. U roztoků 36NF a 4PF+K tento efekt vidět nebyl z důvodu, že tyto roztoky měly u všech experimentů (Fixace II–IV) celkově velmi nízké výtěžky. U jaterní tkáně z Fixace IV pak byly dokonce pozorovány celkově nižší výtěžky DNA (patrné i u kontrolní zamražené tkáně) oproti Fixaci II a III. Zhoršená kvalita DNA se pak výrazně projevila i na STR analýze vzorků z Fixace IV. Zde bylo detekováno nejvíce nekorektních výsledků, časté drop-out efekty či velmi nízké výšky píků u jednotlivých alel v profilu. Vzhledem k tomu, že Fixace IV se od Fixace II a III odlišovala průběhem PMI (u Fixace IV byl PMI dlouhý (5–6 dní) a po většinu času probíhal v pokojové teplotě oproti Fixaci II (7 dní, 4–10 °C) a Fixaci III (3 dny, 4–10 °C)), výraznou roli v tomto případě pravděpodobně sehrává stav, v němž se DNA nachází už před vstupem do experimentu. Po smrti totiž dochází k rychlému poškození DNA zahrnující vznik inter- a intramolekulárního zesíťování, fragmentaci DNA, vznik abazických míst a modifikaci nukleotidů (Lindahl, 1993). Dále bylo popsáno, že k posmrtné degradaci DNA dochází postupně a s prodlužující se délkou PMI se množství fragmentované DNA zvyšuje (Johnson *et al.*, 2002; Hansen *et al.*, 2014). Kromě délky PMI, má však na degradaci DNA významný vliv i vyšší teplota v jeho průběhu, která zvyšuje rychlost reakcí způsobujících rozpad DNA (Johnson *et al.*, 2002).

Navíc bylo ukázáno, že u FFPE bloků připravených ze vzorků s delším PMI se zhoršuje amplifikovatelnost DNA v porovnání se vzorky s kratším PMI nebo se vzorky zamraženými (Hansen *et al.*, 2014), což vysvětluje naše pozorování, kde je u všech tkání Fixace IV v porovnání s Fixací II a III dosaženo nižších výtěžků DNA, vyšší degradace a horších STR profilů po působení fixačních činidel v časech 22 hod. a 46 hod.

Efekt délky PMI se na kvalitu DNA navíc u různých tkání projevuje jinou měrou. Výrazný negativní vliv má především na tkáň jaterní a ledvinnou (El-Harouny *et al.*, 2009; Osaretin *et al.*, 2015). Pomalou DNA degradací se naopak vyznačuje mozková tkáň (Gomaa *et al.*, 2013) a poměrně stabilní DNA, která je využitelná pro následné analýzy, lze získat i z tkáně svalové (Hansen *et al.*, 2014). To vysvětluje rozdíly ve výsledcích mezi svalovou a jaterní tkání u Fixace IV, kde jsme detekovali celkově nižší koncentrace DNA, vyšší míru degradace a horší STR profily právě u jaterní tkáně. Příčinou rozdílné stability je pravděpodobně obecně vyšší ribonukleázová aktivita u některých tkání jako jsou játra či ledviny (Gomaa *et al.*, 2013; Johnson *et al.*, 2002).

Nicméně vliv na stav DNA má kromě dané tkáně, délky a teploty během PMI také řada dalších faktorů, jako pohlaví, věk, příčina smrti, tělesná stavba, exogenní podmínky

(vlhkost, pH, přístup vzduchu) a mnoho dalších (Ferreira *et al.*, 2013), které v rámci naší práce nebyly zkoumány.

V této práci byl také sledován vliv roztoku DNAgard Tissue (Biomatrix, USA) na srdeční tkáň fixovanou roztoky 4PF, 4NF, 36NF a 4PF+K po 1 hod., 22 hod. a 46 hod. Tkáň byla do roztoku DNAgard Tissue (Biomatrix, USA) umístěna na 24 hod. před samotnou fixací. Výrobce udává, že tento roztok ochrání DNA před degradací až po dobu 6 měsíců, je-li v něm tkáň naložena. Bylo tedy testováno, zda-li by krátkodobé umístění tkáně do roztoku DNAgard Tissue (Biomatrix, USA) před fixací nepomohlo zachovat kvalitu a kvantitu DNA při následné fixaci. Měření ukázalo, že se tomu tak neděje a výtěžky DNA jsou sníženy stejně, jako když k ošetření roztokem DNAgard Tissue (Biomatrix, USA) nedochází. Důvodem nejspíše bylo, že roztok DNAgard Tissue (Biomatrix, USA) DNA chemicky trvale nemodifikuje, a tedy ji před změnami chrání pouze, pokud se s ní nachází v trvalém kontaktu.

Z naší práce také vyplývá možnost srovnání jednotlivých metod, které lze použít pro stanovení množství DNA a míry její degradace po izolaci z FFPE bločků. Výsledky koncentrace DNA získané pomocí qPCR a pomocí fluorometrického měření byly srovnatelné. Toto je v souladu s literaturou (Sedlackova *et al.*, 2013), která uvádí, že fragmentace DNA má na fluorometrické určení koncentrace DNA obdobně negativní vliv jako na stanovení koncentrace DNA pomocí qPCR. Rozdíl byl pouze při fixaci po dobu 1 hod. u fixace v roztoku 4PF+K, kde fluorometrickým měřením byla stanovena výrazně vyšší koncentrace DNA než pomocí qPCR. Vzhledem k tomu, že takovýto rozdíl mezi qPCR měřeními a fluorometrickým měřením nebyl zaznamenán u ostatních roztoků, lze se domnívat, že je toto způsobeno přidáním kyseliny mravenčí. Ta způsobuje vyšší výskyt modifikovaných bazí a abazických míst na DNA než samotný formaldehyd (Koshiba *et al.*, 1993; Williams *et al.*, 1999), na což je pravděpodobně metoda qPCR citlivější, než fluorometrické měření.

Dále můžeme porovnat měření fragmentace metodou qPCR a na bioanalyzáru Agilent 2100 (metodou elektroforézy na čipu). Primery použité v této práci tvoří produkty o relativně blízké velikosti (63 bp a 229 bp). Přestože jsou tyto amplikony vhodné vzhledem k následné STR analýze (která pracuje v tomto velikostním rozsahu), postihují relativně malý rozsah možností fragmentace DNA, a tudíž nejsou zcela vhodné pro hlubší zkoumání fragmentace DNA. Toto zvláště vyniká při porovnání s měřeními na bioanalyzáru Agilent 2100 (Agilent Technologies, USA), který v případě provedených měření detekoval fragmenty DNA o velikostech větších než 10 000 bp. Jelikož v rámci Alu

sekvencí nelze vytvořit amplikony řádově o tisících až desetitisících bazí, přináší měření na přístroji bioanalyzátor Agilent 2100 (Agilent Technologies, USA) podstatné rozšíření informací o stupni fragmentace DNA. Zajímavé nicméně je, že měření na bioanalyzátoru většinou neukázalo přítomnost kratších fragmentů (okolo 400–600 bp), které jsou dle literatury pro fixaci ve formaldehydu běžné (Hansen *et al.*, 2014). To může být způsobeno tím, že DNA byla z fixované tkáně izolována krátce po fixaci a chybělo tedy období dlouhodobějšího skladování, při kterém by docházelo k výraznější fragmentaci DNA (Turashvili *et al.*, 2012).

Dohromady výsledky měření ukazují, že snižuje-li se v daném fixačním čase a fixačním roztoku množství fragmentů o velikosti řádově 10^3 až 10^4 bp stanovených bioanalyzátor, snižuje se koncentrace DNA naměřená metodou qPCR a fluorometrickým měřením a zvyšuje se fragmentace naměřená metodou qPCR.

Možností, jak se vyhnout fixaci formaldehydem a s tím spojeným problémům, by mohlo být použití tzv. molekulárních fixačních činidel, jako je například PAXgene (Qiagen, Německo). Molekulární fixační činidla totiž mají stejně dobře zachovávat morfologický a antigenní profil tkáně, navíc však mají být šetrnější k nukleovým kyselinám. Literatura uvádí, že ačkoliv molekulární fixační roztoky mohou přinášet benefit v případě RNA, v případě DNA poskytují srovnatelnou kvalitu s formaldehydem. Při jejich použití však odpadá nutnost kontroly kvality formaldehydu (Belloni *et al.*, 2013; Staff *et al.*, 2013).

Je nutné mít na paměti, že ačkoliv jsou zde prezentovány výsledky získané z tkání fixovaných formaldehydem, nebyly tyto zalité do parafínu, což je jinak běžnou součástí histologické praxe. Nutnost manipulace s parafínem by vnesla další proměnné, především procesem odstranění parafínu. Nicméně parafín sám o sobě by neměl DNA nikterak chemicky modifikovat (Hewitt *et al.*, 2008), a tudíž byl záměrně opomenut.

V dalších experimentech by bylo vhodné racionalizovat použití fixačních roztoků. Například u roztoku 4PF+K by koncentrace kyseliny mravenčí mohla být odvozena od skutečně používaných roztoků v konkrétních klinických laboratořích. Stejně tak by se mohla upravovat koncentrace formaldehydu blíže okolo hodnoty 4 %. Popřípadě by mohlo být použito přímo roztoků zapůjčených z klinických pracovišť. Dále by bylo zajímavé zahrnout pH či teplotu roztoku do proměnných, které ovlivňují kvalitu vyizolované DNA. Zahrnuto by mohlo být také více vzorků s různými délkami a teplotními průběhy PMI tak, aby byly potvrzeny výsledky z této studie.

6 Souhrn

Cílem předkládané diplomové práce bylo posoudit vliv fixace tkání ve fixačních roztocích založených na formaldehydu na kvalitu a kvantitu izolované DNA. Za tímto účelem byly různými metodickými přístupy zkoumány dva faktory, které ovlivňují míru fragmentace a množství vyizolované DNA.

Prvním faktorem byla délka fixace. Zde bylo ukázáno, že čím déle fixace probíhala, tím nižší výtěžky a méně kvalitní DNA byla získána, což platí pro všechny použité fixační roztoky. Druhým zkoumaným faktorem bylo chemické složení fixačního roztoku formaldehydu. Bylo ukázáno, že pro molekulárně biologické metody je z testovaných fixačních činidel založených na formaldehydu nejvhodnější 4% pufrovaný formaldehyd. Jen mírně zhoršenou kvalitu a kvantitu DNA poskytovaly vzorky fixované 4% nepufrovaným formaldehydem. U obou fixačních činidel se pak projevil zásadní vliv typu tkáně a stavu vstupní DNA na možnost vyizolovat kvalitní DNA po fixaci. Byť se při krátkodobé fixaci nebo zamražení tento efekt ještě nemusí projevit, při dlouhodobějším působení je u tkání s delším PMI probíhajícím za pokojové teploty patrná vyšší citlivost i k 4% nepufrovanému formaldehydu a dokonce i 4% pufrovanému formaldehydu než u tkání s kratším PMI nebo PMI probíhajícím za teplot do 10 °C. To se projevilo také na možnosti získat úplný DNA profil v STR analýze. Další chemické modifikace již ovlivňují stupeň fragmentace a množství vyizolované DNA velmi zásadně, jak bylo ukázáno na výsledcích pro 36% nepufrovaný formaldehyd a 4% pufrovaný formaldehyd s 4% kyselinou mravenčí. Pokud fixace těmito činidly probíhala po delší dobu, která by ale pravděpodobně byla nutná pro dobré profixování tkáně, zhoršovaly výrazně měřené parametry vyizolované DNA a zároveň neposkytovaly dostatečně kvalitní materiál pro stanovení DNA profilu v STR analýze.

Obecné doporučení pro přípravu fixovaných preparátů vzhledem k jejich následné analýze s využitím molekulárně biologických metod je tedy používat opravdu správně ředěný a pufrovaný 4% formaldehyd, jelikož i mírnější chemická modifikace může při déle trvající fixaci či delším PMI tkáně způsobovat komplikace. V případě, že si nejsme jisti kvalitou formaldehydu, je třeba dbát na to, aby fixace trvala pouze nezbytně dlouhou dobu. Nicméně, to je skutečnost, kterou je lepší dodržovat i při použití kvalitního formaldehydu.

7 Použitá literatura

- Ahn SJ, Costa J, Emanuel JR. PicoGreen quantitation of DNA: effective evaluation of samples pre- or post-PCR. *Nucleic Acids Res.* 1996 Jul 1;24(13):2623-5.
- Andréasson H, Gyllensten U, Allen M. Real-time DNA quantification of nuclear and mitochondrial DNA in forensic analysis. *Biotechniques.* 2002 Aug;33(2):402-4, 407-11.
- Alaeddini R, Walsh SJ, Abbas A. Forensic implications of genetic analyses from degraded DNA-A review. *Forensic Sci Int Genet.* 2010 Apr;4(3):148-57.
- Banerjee SK, Makdisi WF, Weston AP, Mitchell SM, Campbell DR. Microwave-based DNA extraction from paraffin-embedded tissue for PCR amplification. *Biotechniques.* 1995 May;18(5):768-70, 772-3.
- Belloni B, Lambertini C, Nuciforo P, Phillips J, Bruening E, Wong S, Dummer R. Will PAXgene substitute formalin? A morphological and molecular comparative study using a new fixative system. *J Clin Pathol.* 2013 Feb;66(2):124-35.
- Ben-Ezra J, Johnson DA, Rossi J, Cook N, Wu A. Effect of fixation on the amplification of nucleic acids from paraffin-embedded material by the polymerase chain reaction. *J Histochem Cytochem.* 1991 Mar;39(3):351-4.
- Bonin S, Petrera F, Niccolini B, Stanta G. PCR analysis in archival postmortem tissues. *Mol Pathol.* 2003 Jun;56(3):184-6.
- Boom R, Sol C, Wertheim-van Dillen P. Rapid purification of ribosomal RNAs from neutral agarose gels. *Nucleic Acids Res.* 1990 Apr 25;18(8):2195.
- Braasch DA, Corey DR. Locked nucleic acid (LNA): fine-tuning the recognition of DNA and RNA. *Chem Biol.* 2001 Jan;8(1):1-7.
- Bussolati G, Annaratone L, Medico E, D'Armento G, Sapino A. Formalin fixation at low temperature better preserves nucleic acid integrity. *PLoS One.* 2011;6(6):e21043.
- Didenko VV, Ngo H, Baskin DS. Early necrotic DNA degradation: presence of blunt-ended DNA breaks, 3' and 5' overhangs in apoptosis, but only 5' overhangs in early necrosis. *Am J Pathol.* 2003 May;162(5):1571-8.
- De Jong D, Verbeke SLj, Meijer D, Hogendoorn PC, Bovee JV, Szuhai K. Opening the archives for state of the art tumour genetic research: sample processing for array-CGH using decalcified, formalin-fixed, paraffin-embedded tissue-derived DNA samples. *BMC Res Notes.* 2011 Jan 4;4:1.
- Deagle BE, Eveson JP, Jarman SN. Quantification of damage in DNA recovered from highly degraded samples--a case study on DNA in faeces. *Front Zool.* 2006 Aug 16;3:11.
- Dedhia P, Tarale S, Dhongde G, Khadapkar R, Das B. Evaluation of DNA extraction methods and real time PCR optimization on formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *Asian Pac J Cancer prev.* 2007 Jan-Mar;8(1):55-9.
- Dorfman KD, King SB, Olson DW, Thomas JD, Tree DR. Chem Rev. Beyond gel electrophoresis: microfluidic separations, fluorescence burst analysis, and DNA stretching. *Chem Rev.* 2013 Apr 10;113(4):2584-667.
- Douglas MP, Rogers SO. DNA damage caused by common cytological fixatives. *Mutat Res.* 1998 Jun 5;401(1-2):77-88.
- Dubeau L, Chandler LA, Gralow JR, Nichols PW, Jones PA. Southern blot analysis of DNA extracted from formalin-fixed pathology specimens. *Cancer Res.* 1986 Jun;46(6):2964-9.
- Dutta D, Park I, Mills NC. Fixation temperature affects DNA integrity in the testis as measured by the TUNEL assay. *Toxicol Pathol.* 2012 Jun;40(4):667-74.

- Duval K, Aubin RA, Elliott J, Gorn-Hondermann I, Birnboim HC, Jonker D, Fournery RM, Frégeau CJ. Optimized manual and automated recovery of amplifiable DNA from tissues preserved in buffered formalin and alcohol-based fixative. *Forensic Sci Int Genet.* 2010 Feb;4(2):80-8.
- El-Harouny M, El-Dakroory S, Attalla S, Hasan N, Hassab El-Nabi S. The Relationship Between Postmortem Interval And Dna Degradation In Different Tissues Of Drowned Rats. *The Internet Journal of Forensic Science.* 2009;4(1).
- Farrugia A, Keyser C, Ludes B. Efficiency evaluation of a DNA extraction and purification protocol on archival formalin-fixed and paraffin-embedded tissue. *Forensic Sci Int.* 2010 Jan 30;194(1-3):e25-8.
- Ferreira MT, Cunha E. Can we infer post mortem interval on the basis of decomposition rate? A case from a Portuguese cemetery. *Forensic Sci Int.* 2013 Mar 10;226(1-3):298.e1-6.
- Ferrer I, Armstrong J, Capellari S, Parchi P, Arzberger T, Bell J, Budka H, Ströbel T, Giaccone G, Rossi G, Bogdanovic N, Fakai P, Schmitt A, Riederers P, Al-Sarraj S, Ravid R, Kretschmar H. Effects of formalin fixation, paraffin embedding, and time of storage on DNA preservation in brain tissue: a BrainNet Europe study. *Brain Pathol.* 2007 Jul;17(3):297-303.
- Fox CH, Johnson FB, Whiting J, Roller PP. Formaldehyde fixation. *J Histochem Cytochem.* 1985 Aug;33(8):845-53.
- Gallagher SR. Quantification of DNA and RNA with absorption and fluorescence spectroscopy. *Curr Protoc Cell Biol.* 2001 May;Appendix 3:Appendix 3D.
- Gibson UE, Heid CA, Williams PM. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res.* 1996 Oct;6(10):995-1001.
- Gilbert MT, Haselkorn T, Bunce M, Sanchez JJ, Lucas SB, Jewell LD, Van Marck E, Worobey M. The isolation of nucleic acids from fixed, paraffin-embedded tissues-which methods are useful when? *PLoS One.* 2007 Jun 20;2(6):e537.
- Goelz SE, Hamilton SR, Vogelstein B. Purification of DNA from formaldehyde fixed and paraffin embedded human tissue. *Biochem Biophys Res Commun.* 1985 Jul 16;130(1):118-26.
- Gomaa MS, El-Khalek AM, Sameer MM. The relationship between the postmortem interval and the DNA degradation in brain and liver of adult albino rats. *J Am Sci.* 2013; 9(5): 535-540.
- Green RL, Lagacé RE, Oldroyd NJ, Hennessy LK, Mulero JJ. Developmental validation of the AmpF ℓ STR \circledR NGM Select TM PCR Amplification Kit: A next-generation STR multiplex with the SE33 locus. *Forensic Sci Int Genet.* 2013 Jan;7(1):41-51.
- Greer CE, Peterson SL, Kiviat NB, Manos MM. PCR amplification from paraffin-embedded tissues. Effects of fixative and fixation time. *Am J Clin Pathol.* 1991 Feb;95(2):117-24.
- Grizzle WE. Special symposium: fixation and tissue processing models. *Biotech Histochem.* 2009 Oct;84(5):185-93.
- Hansen J, Lesnikova I, Funder AM, Banner J. DNA and RNA analysis of blood and muscle from bodies with variable postmortem intervals. *Forensic Sci Med Pathol.* 2014 Sep;10(3):322-8.
- Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 1996 Oct;6(10):986-94.
- Helander KG. Kinetic studies of formaldehyde binding in tissue. *Biotech Histochem.* 1994 May;69(3):177-9.
- Hewitt SM, Lewis FA, Cao Y, Conrad RC, Cronin M, Danenberg KD, Goralski TJ, Langmore JP, Raja RG, Williams PM, Palma JF, Warrington JA. Tissue handling and

- specimen preparation in surgical pathology: issues concerning the recovery of nucleic acids from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *Arch Pathol Lab Med*. 2008 Dec;132(12):1929-35.
- Hoffman EA, Frey BL, Smith LM, Auble DT. Formaldehyde crosslinking: a tool for the study of chromatin complexes. *J Biol Chem*. 2015 Oct 30;290(44):26404-11.
- Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Aug 15;88(16):7276-80.
- Howat WJ, Wilson BA. Tissue fixation and the effect of molecular fixatives on downstream staining procedures. *Methods*. 2014 Nov;70(1):12-9.
- Howe JR, Klimstra DS, Cordon-Cardo C. DNA extraction from paraffin-embedded tissues using a salting-out procedure: a reliable method for PCR amplification of archival material. *Histol Histopathol*. 1997 Jul;12(3):595-601.
- Hudlow WR, Chong MD, Swango KL, Timken MD, Buoncristiani MR. A quadruplex real-time qPCR assay for the simultaneous assessment of total human DNA, human male DNA, DNA degradation and the presence of PCR inhibitors in forensic samples: a diagnostic tool for STR typing. *Forensic Sci Int Genet*. 2008 Mar;2(2):108-25.
- Hughes-Stamm SR, Ashton KJ, van Daal A. Assessment of DNA degradation and the genotyping success of highly degraded samples. *Int J Legal Med*. 2011 May;125(3):341-8.
- Johnson LA, Ferris JA. Analysis of postmortem DNA degradation by single-cell gel electrophoresis. *Forensic Sci Int*. 2002 Mar 28;126(1):43-7.
- Karlsen F, Kalantari M, Chitemerere M, Johansson B, Hagmar B. Modifications of human and viral deoxyribonucleic acid by formaldehyde fixation. *Lab Invest*. 1994 Oct;71(4):604-11.
- Khoja H, Smejkal G, Krowczynska A, Herlihy JD. Optimizing sample fixation and chromatin shearing for improved sensitivity and reproducibility of chromatin immunoprecipitation. Application note. Edition November 2012. <http://covarisinc.com/wp-content/uploads/truChip-Fixation-App-Note.pdf> (k datu 20.7. 2015).
- Kingsbury AE, Foster OJ, Nisbet AP, Cairns N, Bray L, Eve DJ, Lees AJ, Marsden CD. Tissue pH as an indicator of mRNA preservation in human post-mortem brain. *Brain Res Mol Brain Res*. 1995 Feb;28(2):311-8.
- Koshiha M, Ogawa K, Hamazaki S, Sugiyama T, Ogawa O, Kitajima T. The effect of formalin fixation on DNA and the extraction of high-molecular-weight DNA from fixed and embedded tissues. *Pathol Res Pract*. 1993 Feb;189(1):66-72.
- Kreuzer KA, Bohn A, Lass U, Peters UR, Schmidt CA. Influence of DNA polymerases on quantitative PCR results using TaqMan probe format in the LightCycler instrument. *Mol Cell Probes*. 2000 Apr;14(2):57-60.
- Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, Sindelka R, Sjöback R, Sjögreen B, Strömbom L, Ståhlberg A, Zoric N. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med*. 2006 Apr-Jun;27(2-3):95-125.
- Kutyavin IV, Afonina IA, Mills A, Gorn VV, Lukhtanov EA, Belousov ES, Singer MJ, Walburger DK, Lokhov SG, Gall AA, Dempcy R, Reed MW, Meyer RB, Hedgpeth J. 3'-minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. *Nucleic Acids Res*. 2000 Jan 15;28(2):655-61.
- Lee PY, Costumbrado J, Hsu CY, Kim YH. Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *J Vis Exp*. 2012 Apr 20;(62). pii: 3923.

- Legrand B, Mazancourt Pd, Durigon M, Khalifat V, Crainic K. DNA genotyping of unbuffered formalin fixed paraffin embedded tissues. *Forensic Sci Int*. 2002 Feb 18;125(2-3):205-11.
- Lin J, Kennedy SH, Svarovsky T, Rogers J, Kemnitz JW, Xu A, Zondervan KT. High-quality genomic DNA extraction from formalin-fixed and paraffin-embedded samples deparaffinized using mineral oil. *Anal Biochem*. 2009 Dec 15;395(2):265-7.
- Lindahl T. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*. 1993 Apr 22;362(6422):709-15.
- Mueller O, Hahnenberger K, Dittmann M, Yee H, Dubrow R, Nagle R, Ilsley D. A microfluidic system for high-speed reproducible DNA sizing and quantitation. *Electrophoresis*. 2000 Jan;21(1):128-34.
- Nagata S. Apoptotic DNA fragmentation. *Exp Cell Res*. 2000 Apr 10;256(1):12-8.
- Nicklas JA, Buel E. Development of an Alu-based, real-time PCR method for quantitation of human DNA in forensic samples. *J Forensic Sci*. 2003 Sep;48(5):936-44.
- Osaretin AT, Ebuehi MA, Balogun A, Fowora A, Postmortem Time Affects Brain, Liver, Kidney and Heart DNA in Male Rat, *American Journal of Biochemistry*. 2015; 5(1):1-5.
- Paireder S, Werner B, Bailer J, Werther W, Schmid E, Patzak B, Cichna-Markl M. Comparison of protocols for DNA extraction from long-term preserved formalin fixed tissues. *Anal Biochem*. 2013 Aug 15;439(2):152-60.
- Pikor LA, Enfield KS, Cameron H, Lam WL. DNA extraction from paraffin embedded material for genetic and epigenetic analyses. *J Vis Exp*. 2011 Mar 26;(49). pii: 2763.
- Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem*. 1997 Feb 15;245(2):154-60.
- Puchtler H, Meloan SN. On the chemistry of formaldehyde fixation and its effects on immunohistochemical reactions. *Histochemistry*. 1985;82(3):201-4.
- Robertson JM, Dineen SM, Scott KA, Lucyshyn J, Saeed M, Murphy DL, Schweighardt AJ, Meiklejohn KA. Assessing PreCR™ repair enzymes for restoration of STR profiles from artificially degraded DNA for human identification. *Forensic Sci Int Genet*. 2014 Sep;12:168-80.
- Santella RM. Approaches to DNA/RNA Extraction and whole genome amplification. *Cancer Epidemiol Biomarkers prev*. 2006 Sep;15(9):1585-7.
- Santos S, Sá D, Bastos E, Guedes-Pinto H, Gut I, Gärtner F, Chaves R. An efficient protocol for genomic DNA extraction from formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *Res Vet Sci*. 2009 Jun;86(3):421-6.
- Sedlackova T, Repiska G, Celec P, Szemes T, Minarik G. Fragmentation of DNA affects the accuracy of the DNA quantitation by the commonly used methods. *Biol Proced Online*. 2013 Feb 13;15(1):5.
- Sengüven B, Baris E, Oygur T, Berktaş M. Comparison of methods for the extraction of DNA from formalin-fixed, paraffin-embedded archival tissues. *Int J Med Sci*. 2014 Mar 27;11(5):494-9.
- Shedlock AM, Haygood MG, Pietsch TW, Bentzen P. Enhanced DNA extraction and PCR amplification of mitochondrial genes from formalin-fixed museum specimens. *Biotechniques*. 1997 Mar;22(3):394-6, 398, 400.
- Shi SR, Cote RJ, Wu L, Liu C, Datar R, Shi Y, Liu D, Lim H, Taylor CR. DNA extraction from archival formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections based on the antigen retrieval principle: heating under the influence of pH. *J Histochem Cytochem*. 2002 Aug;50(8):1005-11.

- Simpson DA, Feeney S, Boyle C, Stitt AW. Retinal VEGF mRNA measured by SYBR green I fluorescence: A versatile approach to quantitative PCR. *Mol Vis*. 2000 Oct 5;6:178-83.
- Srinivasan M, Sedmak D, Jewell S. Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids. *Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids. Am J Pathol*. 2002 Dec;161(6):1961-71.
- Staff S, Kujala P, Karhu R, Rökman A, Ilvesaro J, Kares S, Isola J. preservation of nucleic acids and tissue morphology in paraffin-embedded clinical samples: comparison of five molecular fixatives. *J Clin Pathol*. 2013 Sep;66(9):807-10.
- Stryer L. Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler. *Annu Rev Biochem*. 1978;47:819-4
- Swango KL, Timken MD, Chong MD, Buoncristiani MR. A quantitative PCR assay for the assessment of DNA degradation in forensic samples. *Forensic Sci Int*. 2006 Apr 20;158(1):14-26.
- Thavarajah R, Mudimbaimannar VK, Elizabeth J, Rao UK, Ranganathan K. Chemical and physical basics of routine formaldehyde fixation. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2012 Sep;16(3):400-5.
- Tokuda Y, Nakamura T, Satonaka K, Maeda S, Doi K, Baba S, Sugiyama T. Fundamental study on the mechanism of DNA degradation in tissues fixed in formaldehyde. *J Clin Pathol*. 1990 Sep;43(9):748-51.
- Turashvili G, Yang W, McKinney S, Kalloger S, Gale N, Ng Y, Chow K, Bell L, Lorette J, Carrier M, Luk M, Aparicio S, Huntsman D, Yip S. Nucleic acid quantity and quality from paraffin blocks: defining optimal fixation, processing and DNA/RNA extraction techniques. *Exp Mol Pathol*. 2012 Feb;92(1):33-43.
- Vacek Z. Histologie a histologická technika I. část – Histologie. Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví v Brně, 1996. ISBN: 80-7013-201-9.
- Vernarecci S. Human Identification Solutions Conference. Madrid 2015. Dostupné na: <http://www.slideshare.net/ThermoFisher/quantifiler-trio-kit-and-forensic-samples-management-a-matter-of-degradation> (k datu 11.8.2016)
- Voytas D. Agarose gel electrophoresis. *Curr Protoc Mol Biol*. 2001 May;Chapter 2:Unit2.5A.
- Walker JA, Kilroy GE, Xing J, Shewale J, Sinha SK, Batzer MA. Human DNA quantitation using Alu element-based polymerase chain reaction. *Anal Biochem*. 2003 Apr 1;315(1):122-8.
- Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques*. 1991 Apr;10(4):506-13.
- Wickham CL, Boyce M, Joyner MV, Sarsfield P, Wilkins BS, Jones DB, Ellard S. Amplification of PCR products in excess of 600 base pairs using DNA extracted from decalcified, paraffin wax embedded bone marrow trephine biopsies. *Mol Pathol*. 2000 Feb;53(1):19-23.
- Williams C, Pontén F, Moberg C, Söderkvist P, Uhlén M, Pontén J, Sitbon G, Lundeberg J. A high frequency of sequence alterations is due to formalin fixation of archival specimens. *Am J Pathol*. 1999 Nov;155(5):1467-71.
- Woolley AT, Mathies RA. Ultra-high-speed DNA fragment separations using microfabricated capillary array electrophoresis chips. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994 Nov 22; 91(24):11348-52.
- Wu L, Patten N, Yamashiro CT, Chui B. Extraction and amplification of DNA from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2002 Sep;10(3):269-74.
- Zhang JH, Xu M. DNA fragmentation in apoptosis. *Cell Res*. 2000 Sep;10(3):205-11.

Zipper H, Brunner H, Bernhagen J, Vitzthum F. Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Res.* 2004 Jul 12;32(12):e103.

8 Přílohy

Tabulka P1: Shrnutí dotazníkového průzkumu ohledně fixačních protokolů používaných na pracovištích patologie a soudního lékařství. Formou elektronického dotazníku bylo obesláno přibližně sto pracovišť soudního lékařství a patologie v České republice. V tabulce jsou uvedeny informace získané od 27 respondentů ohledně typu používaného formaldehydu (pufrovaný nebo nepufrovaný), jeho přípravy a ohledně délky fixace. Vyneseno je také zastoupení jednotlivých odpovědí v procentech.

| 4% formaldehyd | Počet odpovědí | V procentech |
|--|----------------|--------------|
| Nespecifikovalo, že používá pufrovaný | 21 | 78% |
| Specifikovalo, že používá pufrovaný | 5 | 19% |
| Používá oba typy, dle následné analýzy | 1 | 4% |
| Příprava 4% formaldehydu | | |
| Uvedlo, že odebírají již ředěný | 9 | 33% |
| Uvedlo, že ředí sami | 12 | 44% |
| Používá oba způsoby, dle potřeby | 4 | 15% |
| Nespecifikovalo | 2 | 7% |
| Délka fixace | | |
| Používá 12–24 hod. | 20 | 74% |
| Uvedlo i kratší dobu (1–2 hod.), dle velikosti tkáně | 3 | 11% |
| Uvedlo i delší dobu (až 48 hod.), dle velikosti tkáně a doby dodání vzorku | 4 | 15% |

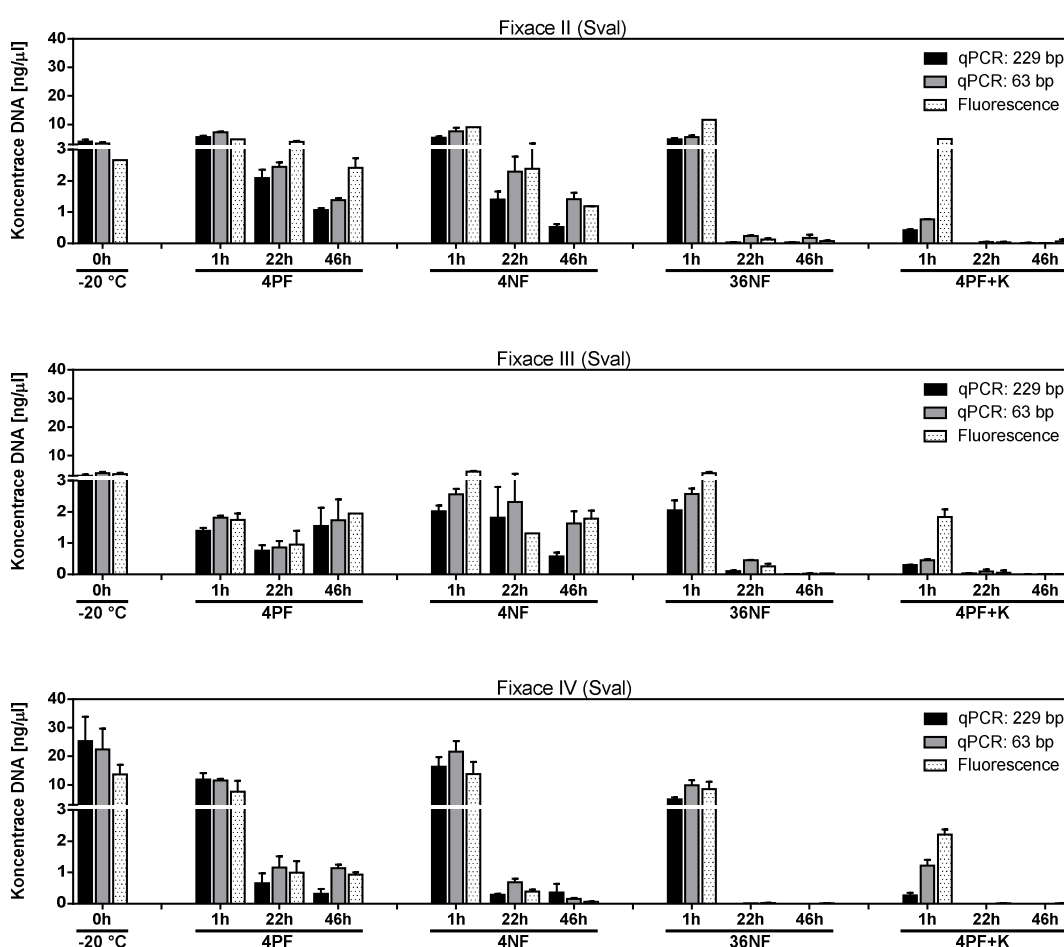
Tabulka P2: Shrnutí dotazníkového průzkumu ohledně protokolů na přípravu tkání fixovaných ve formaldehydu a do zalitých do parafínu (FFPE) používaných na pracovištích patologie a soudního lékařství. Formou elektronického dotazníku bylo obesláno přibližně sto pracovišť soudního lékařství a patologie v České republice. V tabulce jsou uvedeny informace získané od 5 respondentů ohledně přípravy FFPE bločku vybraných tak, aby ukazovaly na variabilitu v protokolech.

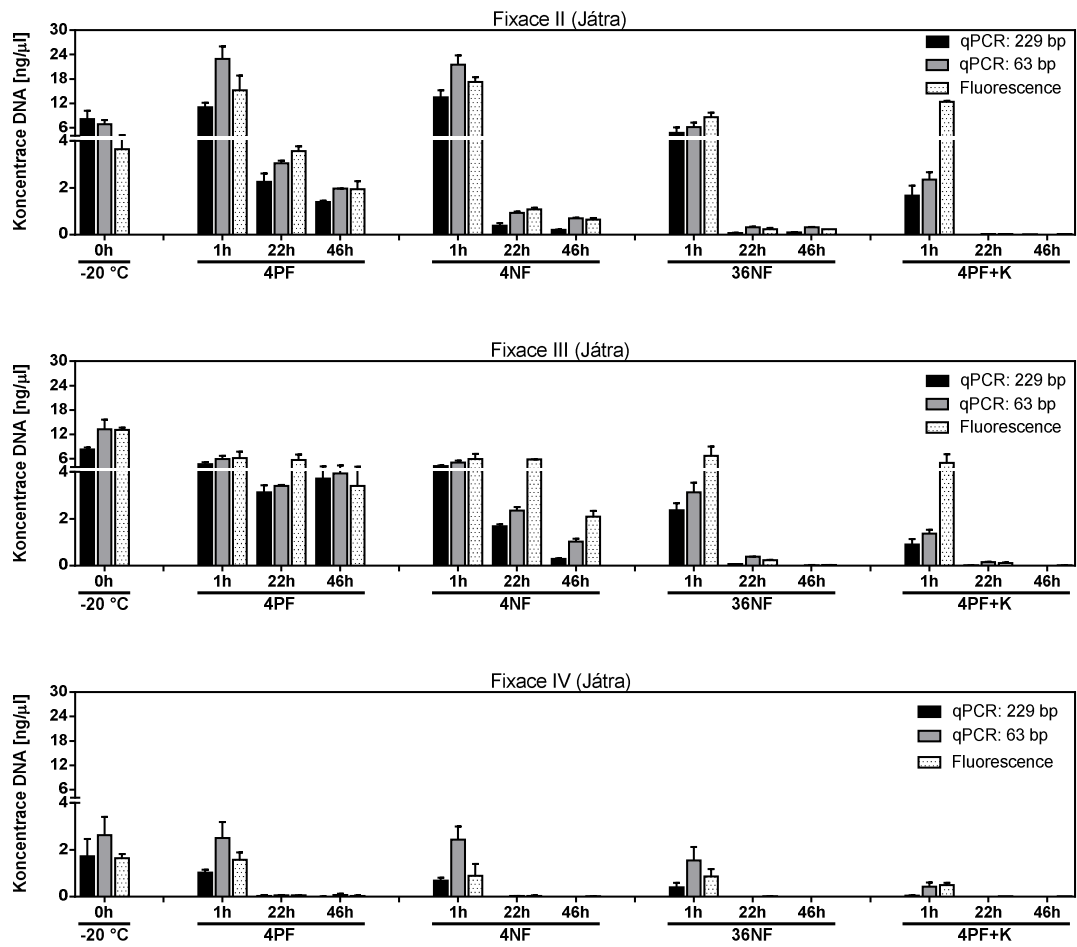
| Fixace formaldehydem 1 hod. – 48 hod. | | | | | | |
|--|------------------------|-----------------------|--------------------------|------------------------|--|----------------------|
| Promytí vodou cca 30 min., pokud je součástí protokolu | | | | | | |
| Odvodnění | 70% EtOH 90 min | 96% EtOH 60 min | 80% EtOH 60 min | 60% EtOH 90 min | 70% EtOH 60 min | 80% EtOH 60 min |
| | 80% EtOH 90 min | 96% EtOH 60 min | 80% EtOH 60 min | 70% EtOH 90 min | 96% EtOH 60 min | 96% EtOH 120 min |
| | 96% EtOH 90 min | 96% EtOH 60 min | 96% EtOH 60 min | 80% EtOH 90 min | 96% EtOH 60 min | 96% EtOH 180 min |
| | 96% EtOH 90 min | 96% EtOH 60 min | 96% EtOH 60 min | 96% EtOH 120 min | 96% EtOH 60 min | 96% EtOH 180 min |
| | Bezvodý EtOH 90 min | 96% EtOH 90 min | 96% EtOH 60 min | | 96% EtOH 60 min | 96% EtOH 240 min |
| | Bezvodý EtOH 90 min | Isopropanol 90 min | 96% EtOH 60 min | | | 96% EtOH 240 min |
| | | | | | | |
| Impregnace látkou umožňující pronikání parafínu | Xylen 90 min | Xylen 60 min | Aceton 60 min | Aceton 90 min | Aceton 60 min | Aceton 30 min |
| | Xylen 90 min | Xylen 90 min | Xylen 60 min | Aceton-Xylen 90 min | Aceton 60 min | Xylen 60 min |
| | Xylen 90 min | Xylen 90 min | Xylen 60 min | Xylen 90 min | Toluen 60 min | Xylen 60 min |
| | | | | | Toluen 60 min | Xylen 60 min |
| | | | | | Toluen 60 min | |
| Uložení do parafínu | Parafín 90 min | Parafín 120 min | Parafín 60 min | Parafín 2 hod | Parafín 60 min | Parafín 15 min |
| | Parafín cca 3 hod | Parafín 120 min | Parafín 60 min | Parafín 3 hod | Parafín 60 min | Parafín cca 3 hod |
| | | | Parafín cca 4-5 hodin | | Parafín 60 min Parafín 60 min | |

Tabulka P3: Seznam kitů na izolaci DNA z FFPE bločků. Tabulka shrnuje komerční kity na izolaci DNA z FFPE bločků dostupných k 5. 5. 2014. Uveden je vždy výrobce, název, katalogové číslo a odkaz na www. stránku.

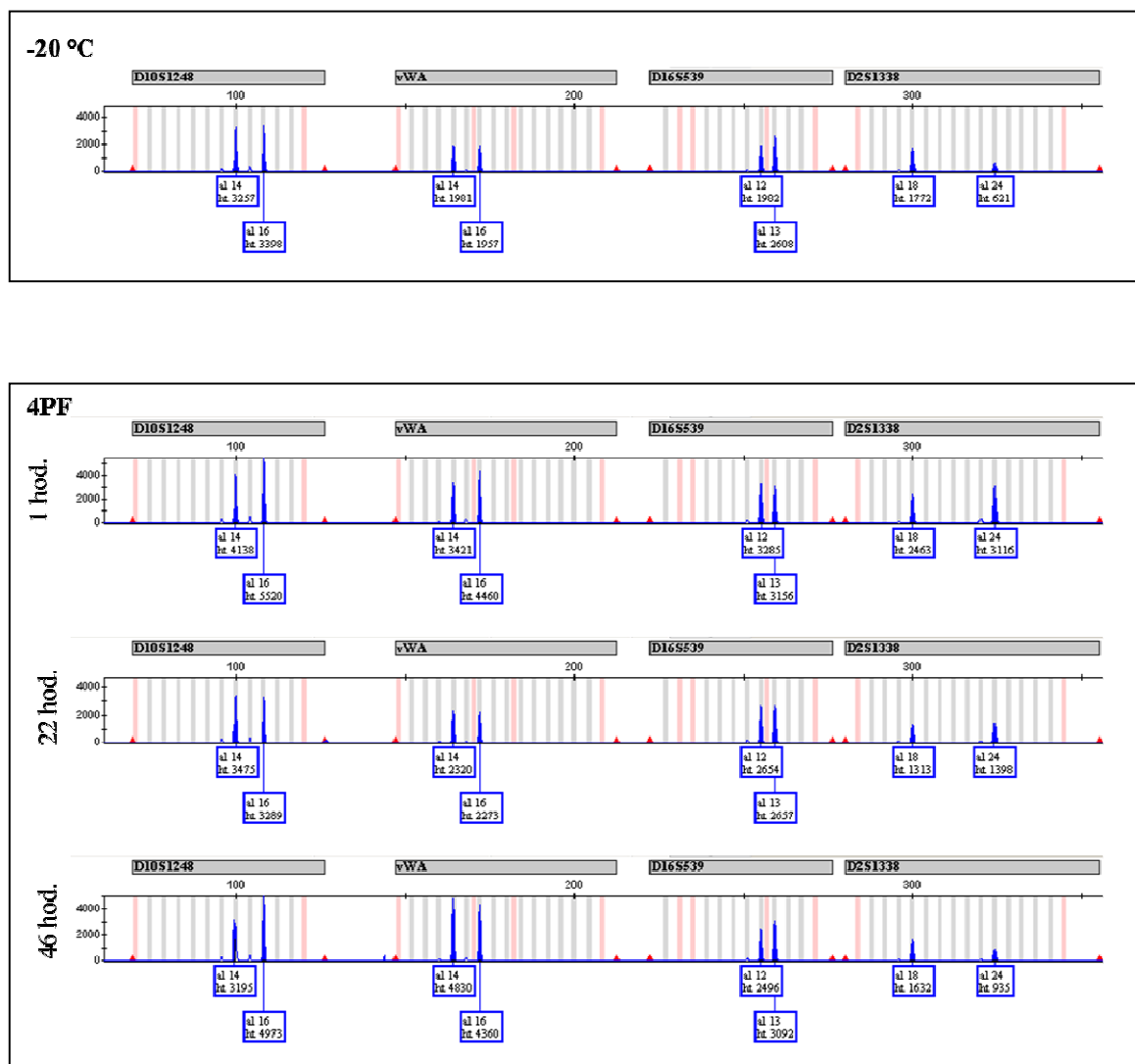
| Výrobce | Název | Kat. číslo | Web |
|-------------------|---|-------------|---|
| Illumina | Infinium FFPE DNA Restoration Solution | WG-321-1001 | http://www.illumina.com/products/infinium_ffpe_dna_restoration_solution.ilmn |
| Illumina | QuickExtract™ FFPE DNA Extraction Kit | QEF81805 | http://www.epibio.com/applications/nucleic-acid-purification-extraction-kits/dna-extraction/quickextract-ffpe-dna-extraction-kit |
| Life Technologies | PicoPure® DNA Extraction Kit | KIT0103 | http://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/KIT0103 |
| Life Technologies | PureLink® Pro 96 Genomic DNA Purification Kit | K1821-04A | http://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/K182104A |
| Macherey-nagel | NucleoSpin® FFPE DNA | 740980.10 | http://www.mn-net.com/Products/DNAandRNAPurification/DNAfromtissueandcells/NucleoSpinFFPEDNA/tabid/11451/language/en-US/Default.aspx |
| Mobio | BiOstic® FFPE Tissue DNA Isolation Kit | 12250-50 | http://www.mobio.com/tissue-cells-dna-isolation/biostic-ffpe-tissue-dna-isolation-kit.html |
| Promega | Reliaprep™ FFPE gDNA Miniprep System | A2351 | http://worldwide.promega.com/products/dna-and-rna-purification/genomic-dna-purification-kits/reliaprep-ffpe-gdna-miniprep-system/?activeTab=0 |
| Qiagen | DNeasy Blood & Tissue Kit (50) | 69504 | http://www.qiagen.com/products/catalog/sample-technologies/dna-sample-technologies/genomic-dna/dneasy-blood-and-tissue-kit#orderinginformation |
| Qiagen | GeneRead DNA FFPE Kit | 180134 | http://www.qiagen.com/products/catalog/sample-technologies/dna-sample-technologies/genomic-dna/generead-dna-ffpe-kit |
| Qiagen | QIAamp DNA FFPE Tissue Kit | 56404 | http://www.qiagen.com/products/catalog/sample-technologies/dna-sample-technologies/genomic-dna/qiaamp-dna-ffpe-tissue-kit |
| Qiagen | QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit | 60404 | http://www.qiagen.com/products/catalog/sample-technologies/dna-sample-technologies/genomic-dna/qiaamp-dsp-dna-ffpe-tissue-kit#orderinginformation |
| Qiagen | QIASymphony DSP DNA Kits | 937255 | http://www.qiagen.com/products/catalog/sample-technologies/dna-sample-technologies/genomic-dna/qiasymphony-dsp-dna-kits |
| Qiagen | REPLI-g FFPE Kit | 150243 | http://www.qiagen.com/products/catalog/sample-technologies/dna-sample-technologies/genomic-dna/repli-g-ffpe-kit |
| Roche | High Pure FFPET DNA Isolation Kit | 6868487001 | http://lifescience.roche.com/shop/products/high-pure-ffpet-dna-isolation-kit#tab-0 |
| Sigma | GenElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep Kits | G1N10-1KT | http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/g1n10?lang=en&region=CZ |
| Sigma | GenomePlex® Complete Whole Genome Amplification (WGA) Kit | WGA2-10RXN | http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/wga2?lang=en&region=CZ |
| Zymo research | ZR FFPE DNA Miniprep™ | D3065 | http://www.zymoresearch.com/dna/genomic-dna/solid-ffpe-tissue-dna/zr-ffpe-dna-miniprep |

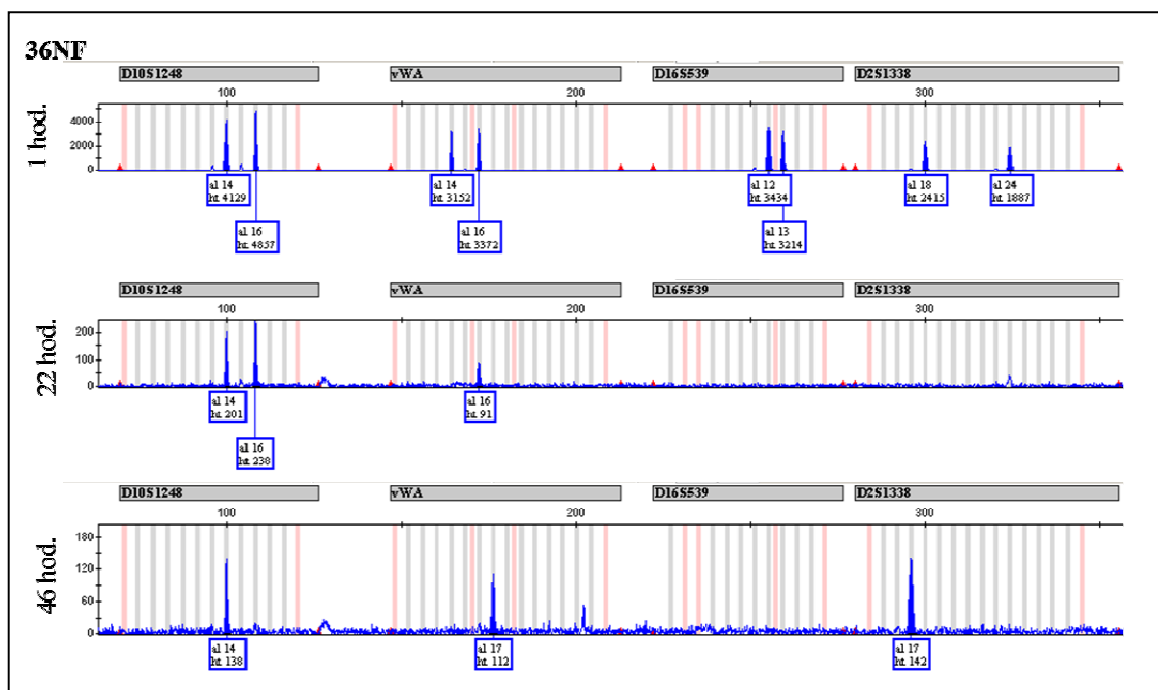
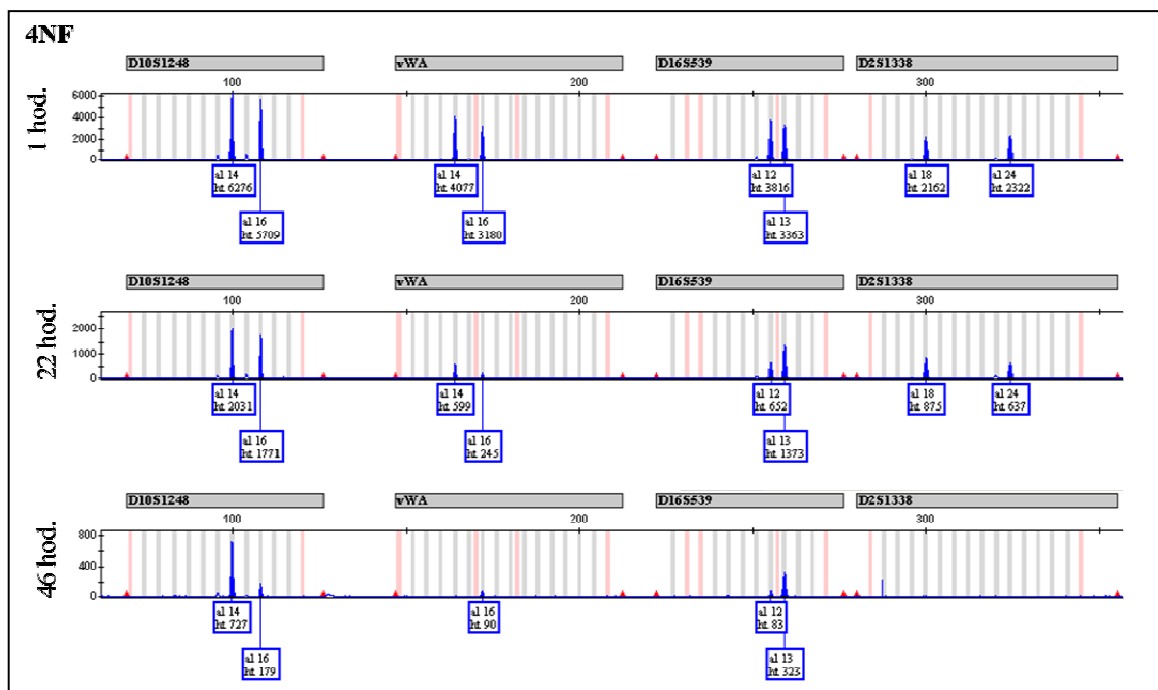
Obrázek P1: Porovnání výtěžků DNA stanovených metodou qPCR a fluorimetrickým měřením. Vzorky z tkáně svalu a jater od tří dárců z Fixace II, III a IV (Fixace II: muž, 50–60 let, PMI 7 dní; teplotní profil: 5 dní 6–10 °C; 2 hod. RT; 48 hod. 4 °C; Fixace III: muž, 82 let, PMI 4 dny; teplotní profil: 3 dny 6–10 °C; 2 hod. RT; 24 hod. 4 °C; Fixace IV: žena, 60 let, PMI 5–6 dní; teplotní profil: 3–4 dny RT, 1 den 6–10 °C; 2 hod. RT; 24 hod. 4 °C) byly fixovány po dobu 1 hod, 22 hod. a 46 hod. v roztocích: 4% (v/v) pufrovaný formaldehyd (4PF), 4% (v/v) nepufrovaný formaldehyd (4NF), 36% (v/v) nepufrovaný formaldehyd (36NF) a 4% (v/v) pufrovaný formaldehyd s 4% (v/v) kyselinou mravenčí (4PF+K). Jako kontrola sloužila tkáň nefixovaná a zmražená na -20 °C, jedná se tedy o čas 0 hod. Poté byla ze vzorků vyizolována DNA a její koncentrace byla stanovena qPCR pomocí dvou párů primerů pro lidské Alu sekveny, které tvořily produkty o délkách 229 bp a 63 bp (hodnoty jsou průměry čtyř hodnot ze vzorků A a B měřených v duplikátech a jejich směrodatné odchylky). Koncentrace DNA byla stanovena i fluorimetrickým měřením (hodnoty jsou průměry dvou hodnot ze vzorků A a B a jejich směrodatné odchylky).

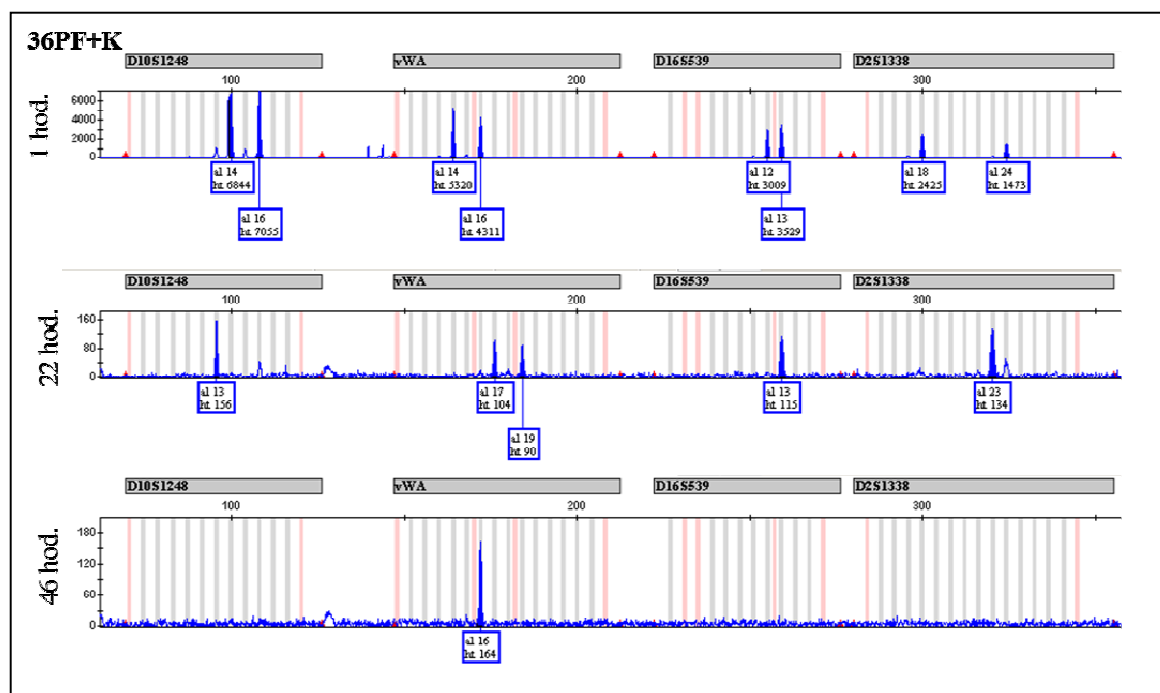




Obrázek P2: Reprezentativní elektroforetogram ukazující STR profil DNA izolované ze svalové tkáně v závislosti na použitém roztoku a délce fixace. Vzorky svalové tkáně z Fixace IV (žena, 60 let, PMI 5–6 dní; teplotní profil: 3–4 dny RT, 1 den 6–10 °C; 2 hod. RT; 24 hod. 4 °C) byly fixovány po dobu 1 hod, 22 hod. a 46 hod. v roztocích: 4% (v/v) pufovaný formaldehyd (4PF), 4% (v/v) nepufovaný formaldehyd (4NF), 36% (v/v) nepufovaný formaldehyd (36NF) a 4% (v/v) pufovaný formaldehyd s 4% (v/v) kyselinou mravenčí (4PF+K). Jako kontrola sloužila tkáň nefixovaná a zmražená na -20 °C, jedná se tedy o čas 0 hod. Poté byla ze vzorků vyizolována DNA, u které byla následně provedena STR analýza. Zobrazen je genotyp z jednoho fluorescenčního kanálu s číslem alely a výškou každého píku [RFU]. Lokusy jsou seřazeny na ose x podle délky ampliconů DNA [bp], na ose y je vynesena intenzita signálu [RFU]. RFU = relative fluorescence unit (relativní fluorescenční jednotka).







Obrázek P3: Reprezentativní elektroforetogram ukazující STR profil DNA izolované z jaterní tkáně v závislosti na použitém roztoku a délce fixace. Vzorky jaterní tkáně z Fixace IV (žena, 60 let, PMI 5–6 dní; teplotní profil: 3–4 dny RT, 1 den 6–10 °C; 2 hod. RT; 24 hod. 4 °C) byly fixovány po dobu 1 hod, 22 hod. a 46 hod. v roztocích: 4% (v/v) pufrovaný formaldehyd (4PF), 4% (v/v) nepufrovaný formaldehyd (4NF), 36% (v/v) nepufrovaný formaldehyd (36NF) a 4% (v/v) pufrovaný formaldehyd s 4% (v/v) kyselinou mravenčí (4PF+K). Jako kontrola sloužila tkáň nefixovaná a zmražená na -20 °C, jedná se tedy o čas 0 hod. Poté byla ze vzorků vyizolována DNA, u které byla následně provedena STR analýza. Zobrazen je genotyp z jednoho fluorescenčního kanálu s číslem alely a výškou každého píku [RFU]. Lokusy jsou seřazeny na ose x podle délky ampliconů DNA [bp], na ose y je vynesena intenzita signálu [RFU]. RFU = relative fluorescence unit (relativní fluorescenční jednotka).

